

Spektrum heteroplasmischer Mutationen in der Kontrollregion mitochondrialer DNA in Gehirn- und Muskelgewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Kevin Gil Hampel
aus Düsseldorf

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfram S. Kunz
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Voss

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.12.2010

Aus der Klinik für Epileptologie der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Christian E. Elger

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Einführung in die mitochondriale Genetik	7
1.2 Transkription und Replikation der mtDNA	8
1.3 Eigenschaften der humanen mtDNA	11
1.3.1 Kopienzahl der mtDNA	11
1.3.2 Vererbung der mtDNA	12
1.3.3 Rekombination der mtDNA	13
1.4 mtDNA-Mutationen	14
1.4.1 Mutationsgeschwindigkeit der mtDNA	14
1.4.2 Pathogene Mutationen und Polymorphismen	14
1.4.3 mtDNA Mutationen und der Alterungsprozess	16
1.5 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.3 Kits.....	20
2.1.4 Enzyme, Primer und Marker	21
2.1.5 Geräte und sonstige Hilfsmittel	21
2.1.6 Software.....	22
2.1.7 Proben	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 DNA-Isolierung (Muskel, Gehirn, Blut, Urin).....	23
2.2.2 PCR-Amplifizierung.....	27
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	30

2.2.5	DHPLC-Analyse	31
2.2.6	Reinigung der PCR-Produkte.....	34
2.2.7	Sequenzierung.....	34
2.2.8	Berechnung des Heteroplasmiegrades	35
2.2.9	Statistik	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Optimierung der PCR-Bedingungen.....	39
3.2	Optimierung der DHPLC-Analyse.....	39
3.3	Mutationsspektrum im postmitotischen Gewebe	42
3.3.1	Punktmutationen	43
3.3.2	Längenpolymorphismen.....	45
3.4	Heteroplasmieverteilung in anderen Geweben.....	47
3.5	Einfluss des Alters auf die Heteroplasmiehäufigkeit.....	48
3.6	Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad.....	50
3.7	Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad spezifischer Mutationen.....	50
4	Diskussion	53
4.1	Häufigkeit heteroplasmischer Punktmutationen der Kontrollregion humaner mtDNA in postmitotischem Gewebe.....	53
4.2	Mutationsspektren von heteroplasmischen Mutationen im D- Loop in postmitotischen und proliferierenden Geweben.....	55
4.3	Sind heteroplasmische Mutationen somatisch oder vererbt?	58
4.4	Wie kommt es zu einer Akkumulation heteroplasmischer Mutationen im Gewebe?	61
5	Zusammenfassung.....	63
6	Abbildungsverzeichnis	65
7	Tabellenverzeichnis	66
8	Literaturverzeichnis	67
9	Danksagung.....	82

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
CPEO	chronisch progressive externe Ophtalmoplegie
CSB 1 / 2 / 3	Conserved Sequence Block
C-tract	Nukleotidsequenz aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Cytosin-Basen
DHPLC	denaturing high performance liquide chromatography, Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
D-Loop	Displacement-Loop, mitochondriale Kontrollregion
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure
F2-Generation	Zweite Filialgeration, Nachkommen der Nachkommen
HSP	Promotor des Schweren Stranges
HV(R) 1 oder 2	hypervariable Region 1 oder 2
kB	Kilo Basenpaar
LHON	Leber's Hereditary Optic Neuropathy
LSP	Promotor des Leichten Stranges
L-Zellen	Zellen von Mausfibroblasten, die nicht anwachsen und keine Cadherine exprimieren
MELAS	Mitochondrial Encephalopathy Lactat-Acidose and Strokeliike Episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
mRNA	Boten RNA
mtDNA	Mitochondriale DNA
NADH	Nicotinsäureamid Adenin Dinukleotid
O _H und O _L	Replikationsursprünge
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
POLG	mitochondriale DNA-Polymerase Gamma
POLRMT	mitochondriale RNA-Polymerase
SD	Standardabweichung

SSO	Sequenzspezifische Oligonukleotide
TBE	Tris Borat EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFAM	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TFB1M / TFB2M	mitochondrialer Transkriptionsfaktor B1 / 2
TMHA	Temperaturmodulierte Heteroduplexanalyse
tRNA	Transfer-RNA

1 Einleitung

1.1 Einführung in die mitochondriale Genetik

Die Mitochondriale DNA ist ein 16.569 Basenpaar langes, zirkuläres, doppelsträngiges Molekül (Anderson et al., 1981). Sie beinhaltet 37 Gene, welche sich aus 2 rRNA Genen, 22 tRNA Genen sowie 13 Genen, die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe kodieren, zusammensetzen (Attardi und Schatz, 1988). Die größte Mehrheit der mitochondrialen Proteine, darunter auch die für die Transkription, Reduplikation und Instandhaltung essentiellen Enzyme wie die DNA-Polymerase Gamma (POLG), die mitochondriale Helikase Twinkle oder die mitochondriale RNA-Polymerase (POLRMT), werden von Genen im Zellkern abgelesen und ins Mitochondrium transportiert (Clayton 1998). Mitochondrien sind die einzigen Zellorganellen, die eine eigene extrachromosomale DNA (außer Chloroplasten in Pflanzen) besitzen, und unterliegen einer dualen genetischen Kontrolle aus nukleärer und mitochondrialer DNA (DiMauro und Davidzon, 2005; McFarland et al., 2007). Im Gegensatz zu chromosomaler DNA beinhaltet menschliche mtDNA keine Introns und besteht hauptsächlich aus kodierenden Abschnitten, mit Ausnahme einiger weniger kurzer nicht kodierender Abschnitte und eines ca. 1,2 kB langen Fragmentes, welches überwiegend regulatorische Funktion besitzt und daher als Kontrollregion oder Displacement-Loop (D-Loop) bezeichnet wird (Pakendorf und Stoneking, 2005). Säugetierzellen besitzen mehrere hundert bis tausend mtDNA-Moleküle, welche in sogenannten Nukleoiden organisiert sind (Falkenberg et al., 2007; Satoh und Kuroiwa, 1991). Nukleoide sind Konglomerate von mehreren mtDNA-Molekülen und Proteinen, darunter für die Replikation wichtige Proteine wie TFAM und Twinkle (Wang und Bogenhagen, 2006).

initiiert, bedarf es der mitochondrialen RNA Polymerase (POLRMT), des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (TFAM) und entweder des mitochondrialen Transkriptionsfaktors B1 (TFB1M) oder B2 (TFB2M) (Falkenberg et al., 2002; Fernandez-Silva et al., 2003). Da die mtDNA Replikation in vivo mit einem RNA Primer startet, könnten folgerichtig alle in der Transkription involvierten Proteine ebenfalls für die Replikation eine entscheidende Rolle spielen. Beispielsweise stimuliert die Zugabe von TFAM in isolierte Mitochondrien nicht nur die Transkription, sondern startet auch die mtDNA Synthese (Garstka et al., 2003; Gensler et al., 2001). Die Dysfunktion eines oder mehrerer an der Transkription beteiligter Proteine könnte daher zur erhöhten Mutagenese mtDNA beitragen.

Replikation und Abbau mtDNA erfolgt, anders als die nukleäre DNA, kontinuierlich und damit unabhängig vom Zellzyklus (Birky, Jr. 2001; Bogenhagen und Clayton, 1977). Für die mtDNA Replikation in vitro sind die DNA-Polymerase Gamma, das Einzelstrang-DNA-bindende Protein und die mitochondriale Helikase Twinkle ausreichend (Korhonen et al., 2004). In vivo bedarf es einer mitochondrialen Transkription um die mtDNA-Replikation zu starten (Schapira 2006). Zwei verschiedene Replikationsmodelle der mtDNA werden in den letzten Jahren häufiger diskutiert (Fish et al., 2004). Das sogenannte „Displacementmodell“ wurde von Clayton und Kollegen, basierend auf Experimenten mit L-Mäusezellen, in welchen die Replikation asymmetrisch und kontinuierlich erfolgte, entwickelt (Clayton 1982; Schmitt und Clayton, 1993; Shadel und Clayton, 1997). In diesem Modell wird die mtDNA Replikation von der Transkription initiiert. Die Replikation startet zunächst von einer speziellen Stelle des Führungsstranges (O_H) in der nicht kodierenden Kontrollregion. Der leichte Strang wird dabei vom neusynthetisierten Strang verschoben, so dass eine Blase bzw. eine Schleife entsteht, weshalb die Kontrollregion auch als „Displacement-Loop“ (D-Loop) bezeichnet wird. Erst wenn zwei Drittel der Replikation erreicht sind, beginnt die Initiation in der entgegengesetzten Richtung auf einer speziellen Seite (O_L) des „leichten Stranges“. In den letzten Jahren wurde dieses Modell von Studien, beruhend auf einer Analyse von Heteroduplex Replikationsintermediaten, angezweifelt und ein alternatives Modell einer symmetrischen und diskontinuierlichen Replikation postuliert (Bowmaker et al., 2003; Holt et al., 2000).

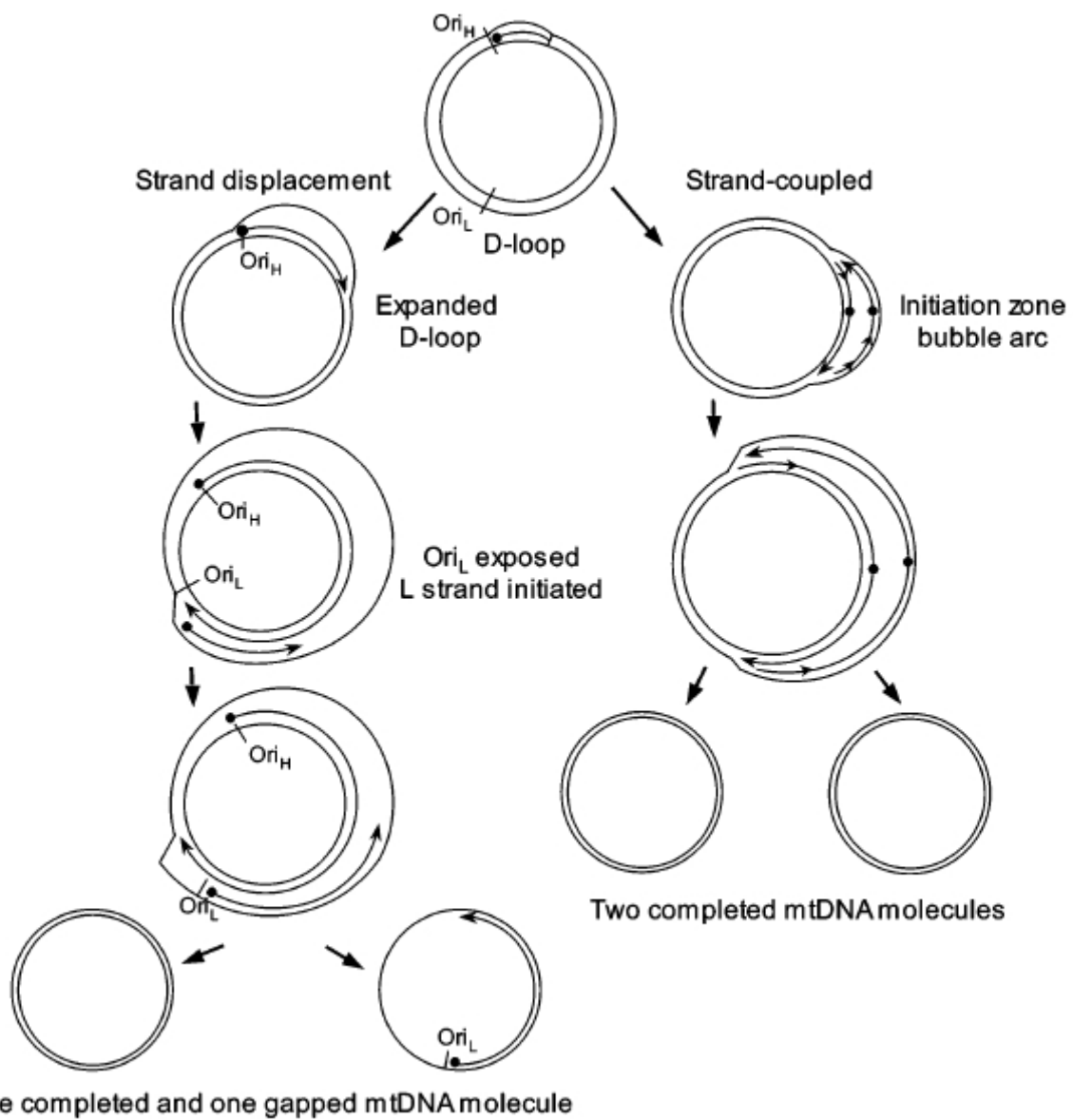


Abb. 2: Schematische Darstellung der mtDNA-Replikationsmodelle (Brown et al., 2005)

1.3 Eigenschaften der humanen mtDNA

1.3.1 Kopienzahl der mtDNA

Eine Säugetierzelle besitzt nur zwei Kopien eines nukleären Gens, aber hunderte bis tausende Kopien mitochondrialer DNA (Robin und Wong, 1988), daher ist mtDNA in den meisten Geweben reichlich vorhanden, einfach aus den Zellen zu isolieren und somit ein geeignetes Forschungsobjekt für Analysen fossiler DNA und bestimmter forensischer Fragestellungen, in welchen nur geringe Mengen DNA vorhanden sind oder in denen die DNA zum Teil schon zerfallen ist (Gill et al., 1994; Ivanov et al., 1996). Die Kopien können alle identisch sein, ein Zustand, der als Homoplasmie bezeichnet wird, oder es können zwei oder mehrere unterschiedliche Kopien vorliegen, ein Zustand der als Heteroplasmie bezeichnet wird (Pakendorf und Stoneking, 2005). Den prozentualen Anteil von Individuen mit heteroplasmischen Mutationen in einer Population bezeichnen wir als Heteroplasmiehäufigkeit. Der Grad der Heteroplasmie (prozentualer Anteil des Mutantallels der mtDNA) eines Individuums kann dabei von Gewebe zu Gewebe und innerhalb des gleichen Gewebes von Zelle zu Zelle schwanken (Barron et al., 2005; Bendall et al., 1997; Chinnery et al., 1999; He et al., 2010; Kirches et al., 2001; Kraysberg et al., 2006; Sekiguchi et al., 2003). Für das hohe Maß an Homoplasmie in der mtDNA von Säugetieren sowie für die schnelle Segregation [eine Änderung in der mtDNA-Sequenz in einem Stammbaum kann innerhalb einer Generation erfolgen (Clayton 1996; Jenuth et al., 1996; Koehler et al., 1991)] wird ein sogenannter genetischer Flaschenhals verantwortlich gemacht: Einer möglichen Erklärung nach wird die Anzahl der mtDNA-Kopien in einer frühen Phase der Oogenese stark reduziert, so dass es zu einer Selektion bestimmter mtDNA-Moleküle kommt, welche die nächste Generation bevölkern (Poulton et al., 1998). Der exakte Mechanismus ist zur Zeit Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen (Cao et al., 2007; Cree et al., 2008; Cree et al., 2009; Khrapko 2008). Laut gängiger Meinung der meisten Wissenschaftler bewahrt der genetische Flaschenhals das mitochondriale Genom vor der Akkumulation schädlicher Mutationen, der sogenannten Müllerschen Sperrklinke (Bergstrom und Pritchard, 1998; Krakauer und Mira, 1999).

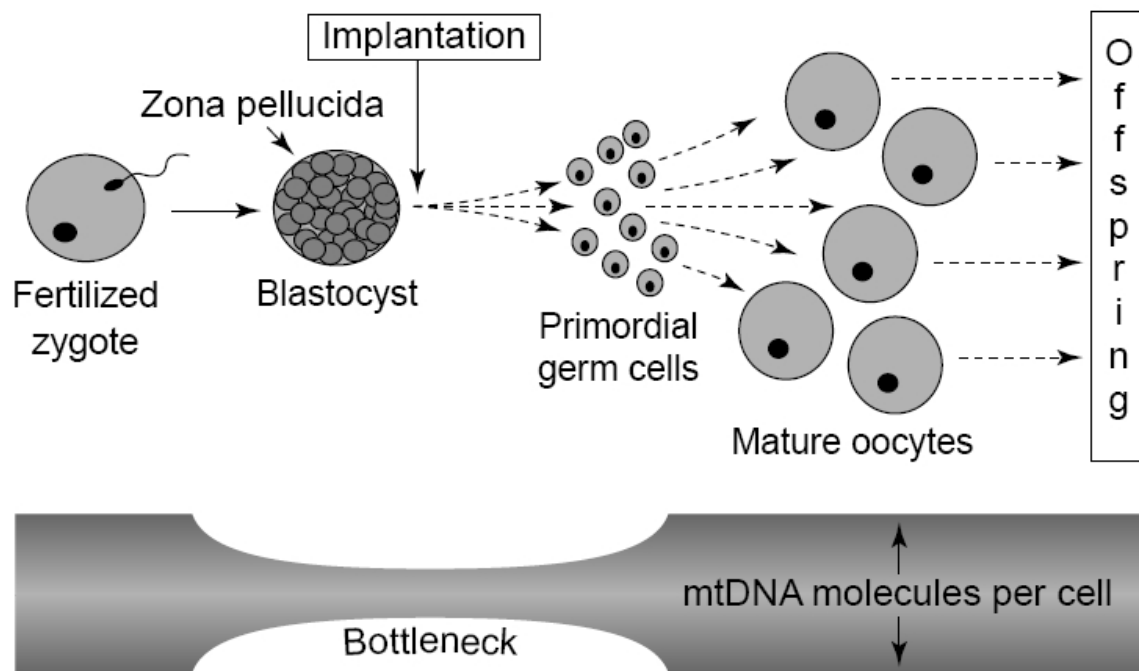


Abb. 3: Schematische Darstellung des genetischen Flaschenhalses (Chinnery et al., 2000b)

1.3.2 Vererbung der mtDNA

Menschliche mtDNA wird strikt über die mütterliche Linie vererbt (Giles et al., 1980). Dieses Dogma ist in jüngster Zeit mehrfach angezweifelt worden. Bei Kreuzungen zwischen verschiedenen Mäusespezies sind geringe Übertragungen väterlicher mtDNA nachgewiesen worden (Gyllenstein et al., 1991). Allerdings haben tiefergehende Studien ergeben, dass die paternale DNA nicht an die Nachkommen der F2-Generation weitergegeben werden (Shitara et al., 1998). Kürzliche Studien eines Patienten mit mitochondrialer Myopathie, dessen muskuläre mtDNA hauptsächlich väterlichen Ursprungs waren, ließen Zweifel an der strikten maternalen Vererbung aufkommen (Schwartz und Vissing, 2002). Nachfolgende Untersuchungen konnten jedoch keine weiteren Fälle paternalen Vererbung menschlicher mtDNA finden (Filosto et al., 2003; Schwartz und Vissing, 2004; Taylor et al., 2003). Das wird dadurch erklärt, dass paternale mtDNA durch den enormen Überschuss mtDNA in der Eizelle verdünnt wird (Cummins et al., 1997). Darüber hinaus ist bekannt, dass spermale Mitochondrien in den Eizellen selektiv zerstört werden (Manfredi et al., 1997; Shitara et al., 1998) und

dass paternale mtDNA durch Ubiquitierung markiert und abgebaut wird (Sutovsky et al., 1999; Sutovsky et al., 2000). Daher scheint es wahrscheinlich, dass der bisher einzige Fall der väterlichen Vererbung eine seltene Ausnahme von der Regel, in der die Erkennung und Elimination der väterlichen mtDNA fehlgeschlagen ist, darstellt.

1.3.3 Rekombination der mtDNA

Lange Zeit galt die Abwesenheit von Rekombination humaner mtDNA als etabliertes Faktum und ist auch heute noch eine weitverbreitete wissenschaftliche Sichtweise (Irwin et al., 2009; Pakendorf und Stoneking, 2005; Stoneking und Soodyall, 1996; Wallace et al., 1999), obwohl die Möglichkeit zur Rekombination besteht, da Mitochondrien die dafür notwendige Enzyme besitzen und einem konstanten Teilungs- und Fusionsprozess unterliegen, welche die Kommunikation zwischen den Mitochondrien einer Zelle ermöglichen (Margineantu et al., 2002; Thyagarajan et al., 1996; Westermann 2002). Erste Zweifel an der völligen Abwesenheit von Rekombination humaner mtDNA beruhten auf einer „linkage-equilibrium“-Analyse (Awadalla et al., 1999). Allerdings konnten die Schlussfolgerungen der Autoren in anderen Studien nicht bestätigt werden (Elson et al., 2001; Innan und Nordborg, 2002). Vor kurzem gelang der erste experimentelle Nachweis von Rekombination an dem einzigen bisher entdeckten menschlichen Individuum mit biparentaler Vererbung des mitochondrialen Genoms (Kraytsberg et al., 2004). Kurze Zeit später wurde Rekombination mtDNA in humanen Hybridzellen beschrieben (D'Aurelio et al., 2004; Sato et al., 2005). In weiteren Studien wurde die Rekombination der mtDNA im Muskelgewebe von Individuen mit multipler Heteroplasmie nachgewiesen und die Vererbung rekombinater mtDNA in zwei Familien mit multipler Heteroplasmie gezeigt (Zsurka et al., 2005; Zsurka et al., 2007). Dennoch ist ihre Bedeutung für die Evolution der mtDNA nicht geklärt (Elson und Lightowlers, 2006; White et al., 2008; White und Gemmell, 2009). Da paternale Vererbung sehr selten zu sein scheint, würde jegliche Rekombination in mtDNA-Molekülen enden, die sich nicht vom ursprünglichen Molekül unterscheiden (Pakendorf und Stoneking, 2005). Als Ausnahme gelten nur Mitochondrien mit multipler mtDNA Heteroplasmie (Santos et al., 2005; Zsurka et al., 2005; Zsurka et al., 2007).

1.4 mtDNA-Mutationen

1.4.1 Mutationsgeschwindigkeit der mtDNA

Die Mutationsgeschwindigkeit mtDNA ist mit einer Rate von $0,017 \times 10^{-6}$ Mutationen pro Position pro Jahr für das gesamte mitochondriale Genom ohne Kontrollregion um einige Größen höher als die von nukleären Genen (Ingman et al., 2000; Khrapko et al., 1997; Parsons et al., 1997). Für die hypervariablen Regionen (HVR I und II) der Kontrollregion ist diese Geschwindigkeit noch höher, wobei die genaue Mutationsgeschwindigkeit zur Zeit noch diskutiert wird. Die Berechnungen schwanken zwischen einer Mutationsgeschwindigkeit von $0,075-0,165 \times 10^{-6}$ Mutationen pro Position pro Jahr aus phylogenetischen Vergleichen und $0,0-1,46 \times 10^{-6}$ Mutationen pro Position pro Jahr aus Familien- oder Stammbaumstudien, was mit einem Durchschnitt von $0,47 \times 10^{-6}$ Mutationen pro Position pro Jahr signifikant höher ist (Hasegawa et al., 1993; Howell et al., 2003; Stoneking et al., 1992; Tamura und Nei, 1993; Ward et al., 1991). Bei der Klärung dieser Unterschiede spaltet sich das mitochondriale Feld in zwei große Lager. Eine Seite postuliert, dass sogenannte „mutational hotspots“, die drei- bis sechsmal so häufig mutieren wie die durchschnittliche Position, für diese Unterschiede in den Mutationsgeschwindigkeiten verantwortlich sind (Hasegawa et al., 1993; Heyer et al., 2001; Meyer et al., 1999). Die durch die Instabilität bedingten Vor- und Rückmutationen der „mutational hotspots“ werden nur in den Stammbaumstudien mitgezählt, nicht aber in den phylogenetischen Vergleichen. Andere Wissenschaftler glauben, dass Rekombination eine bessere Erklärung für die beobachteten Rückmutationen sei (Eyre-Walker et al., 1999; Zsurka et al., 2007).

1.4.2 Pathogene Mutationen und Polymorphismen

Mitochondriale Mutationen können pathogene Eigenschaften besitzen oder eine genetische Normvariante ohne schädliche Auswirkungen darstellen, sogenannte Polymorphismen. Die ersten pathogenen mtDNA Mutationen wurden in den späten achtziger Jahren identifiziert: Große Deletionen und Punktmutationen wurden in Patienten mit chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie (CPEO) sowie dem Kearns Sayre Syndrom und Punktmutationen wurden in Patienten mit mitochondrialer

Enzephalopathie mit apoplektiformen Episoden (MELAS) gefunden (Goto et al., 1990; Holt et al., 1988; Zeviani et al., 1988). Bis heute wurden über 200 verschiedene mtDNA Punktmutationen und Deletionen mit diversen Krankheiten in Verbindung gebracht (Servidei 2003). Desweiteren können massive Reduktionen der mtDNA Kopienzahl, die sogenannten Depletionen der mtDNA, mit Erkrankungen wie zum Beispiel dem Alpers-Huttenlocher Syndrom assoziiert sein (Naviaux und Nguyen, 2004; Zsurka et al., 2008). Deletionen und tRNA-Mutationen führen über eine allgemeine Störung der mitochondrialen Proteinsynthese zu einem Defekt der Atmungskette (Bandelt et al., 2006). Um pathogene Mutationen von harmlosen Polymorphismen zu unterscheiden, müssen laut DiMauro und Davidson (2005) vier Kriterien erfüllt sein: Erstens sollte die Mutation nicht in gesunden Individuen der gleichen ethnischen Gruppe vorkommen, zweitens sollte die Mutation an einer in der Evolution hochkonservierten Stelle liegen, drittens sollte sie eine Dysfunktion der Atmungskette in dem betroffenen Gewebe nach sich ziehen und viertens sollte im Falle einer heteroplasmischen Mutation, eine Korrelation zwischen dem Mutationsgrad und der Schwere der Dyfunktion bestehen. Heteroplasmische Mutationen sind meist rezessiv, da die Zellen hohe Mutationsgrade tolerieren (typischerweise zwischen 70 und 90 %), bevor sie einer Störung der Atmungskette entwickeln (King und Attardi, 1988). Dieser sogenannte Schwellenwert variiert von Mutation zu Mutation und von Gewebe zu Gewebe (Rossignol et al., 2003). Die Mehrheit der pathogenen Mutationen ist heteroplasmisch (DiMauro und Davidzon, 2005). Es gibt aber auch Erkrankungen wie die Lebersche Optikusatrophie (LHON) oder bestimmte Epilepsieformen, welche durch homoplasmische Mutationen verursacht werden können (Chinnery et al., 2000a; Zsurka et al., 2010). Die Grenze zwischen pathogenen Mutation und Normvarianten scheint zum Teil fließend: So gibt es in kürzlich durchgeführten Studien immer mehr Hinweise auf die Assoziation von mtDNA-Polymorphismen und bestimmter Erkrankungen wie M. Parkinson, M. Alzheimer, männlicher Unfruchtbarkeit, Typ 2 Diabetes melitus und idiopathischer Kardiomyopathie (Poulton et al., 2002; Ruiz-Pesini et al., 2000; van der Walt et al., 2003; van der Walt et al., 2004).

1.4.3 mtDNA Mutationen und der Alterungsprozess

Die mitochondriale Theorie des Alterns geht auf Harmans Theorie der freien Radikale von 1956 zurück und beruht auf der Idee eines circulus vitiosus (Harman 1956): mtDNA Mutation führen zu einer Dysfunktion der Atmungskette, welche ihrerseits eine vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen nach sich zieht. Diese verursachen wiederum weitere mtDNA Mutationen (Jacobs 2003).

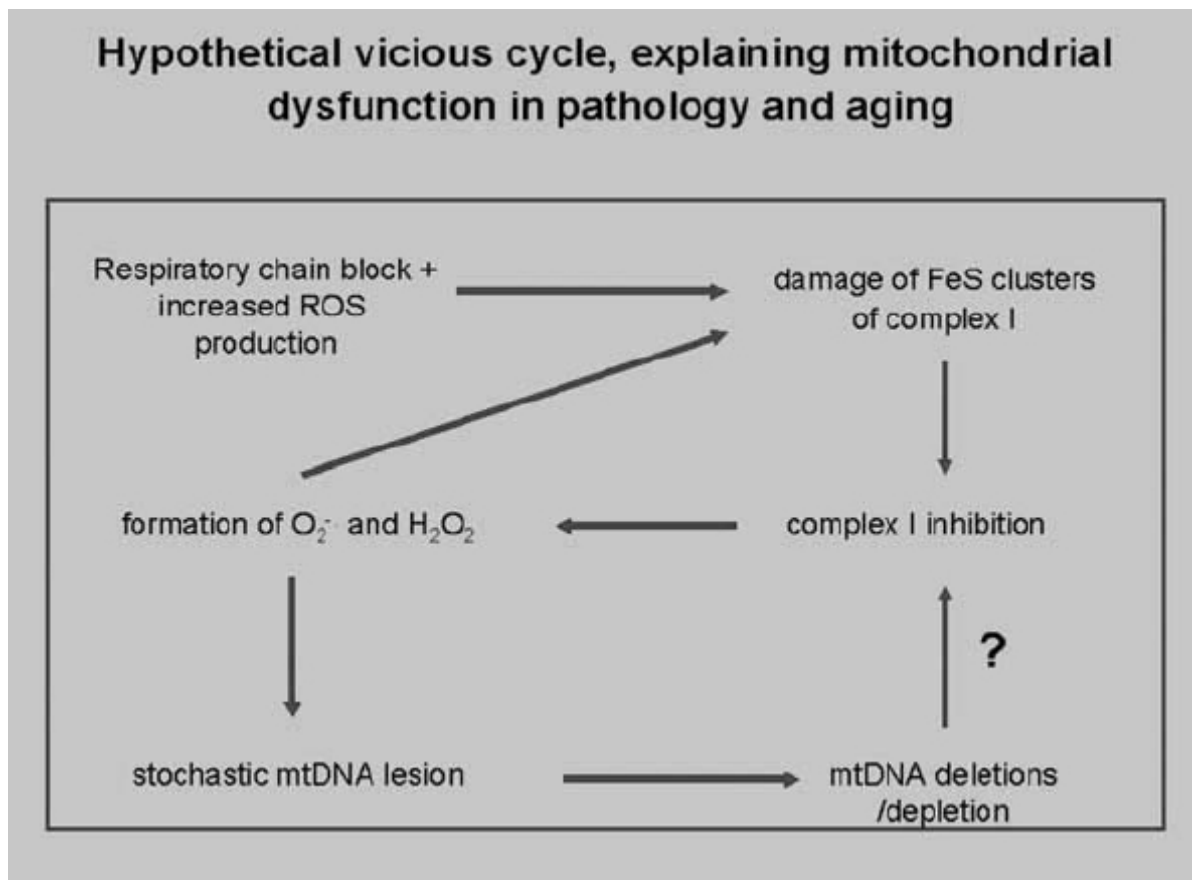


Abb. 4: Schematische Darstellung des circulus vitiosus der Alterstheorie (Wiesner et al., 2006)

Um diese Theorie zu überprüfen, sollten laut Wiesner et al. (2006) folgende Fragen geklärt werden: Werden freie Radikale in der Nähe der Mitochondrien generiert und können sie deren DNA schädigen? Akkumulieren mtDNA-Mutationen im Alter und können sie aufgrund dessen die mitochondrialen Funktionen beeinträchtigen? Führt eine Anhäufung mtDNA Mutationen zur vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen?

Tatsächlich ist mtDNA oxidativem Stress ausgesetzt. Superoxide werden unter regulärem Elektronentransport produziert und vom Komplex I in der mitochondrialen Matrix freigesetzt (Kudin et al., 2004; St-Pierre et al., 2002). Es werden zwei Hauptmechanismen der Mutagenese durch Sauerstoffradikale diskutiert: Die Bildung von 8-OH-Guanosin sowie die Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Klungland et al., 1999; Liochev und Fridovich, 1994). Die Suche nach mtDNA-Mutationen, welche möglicherweise im Alter akkumulieren, wurde dadurch angeregt, dass spezifische mtDNA-Deletionen und auch Punktmutationen die Zellfunktionen tiefgehend schädigen können, wenn sie ein bestimmtes Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp überschreiten (Schwellenwerteffekt) (Rossignol et al., 2003). Einige Studien berichteten über Akkumulation sowohl von unterschiedlichen Punktmutationen als auch von Deletionen im Alter in verschiedenen Gewebetypen (Bodyak et al., 2001; Kajander et al., 2000; Michikawa et al., 1999; Murdock et al., 2000; Wang et al., 2001). Die Frage nach ihrer Wirkung auf die Zellen blieb allerdings noch offen, da entweder eine direkte pathogene Wirkung nicht nachgewiesen werden konnte oder die Mutationslast zu gering war, um eine Beeinträchtigung der Zellfunktion zu erklären (Bodyak et al., 2001; Kajander et al., 2000). Erst in kürzlich veröffentlichten Einzel-Zell-Studien gelang der Nachweis großer Mengen klonal-expandierter Deletionen in gealterten Neuronen der Substantia nigra, welche in direkter Verbindung zu einer mitochondrialen Dysfunktion und damit zu einem Zellschaden standen (Bender et al., 2006; Kraytsberg et al., 2006). Die Frage lautet also nicht, ob die Menge einer bestimmten Mutation in einem Gewebe groß genug ist, um eine funktionale Dysfunktion zu bewirken, sondern ob die Anzahl der Zellen, welche durch eine klonale mtDNA Mutation beeinträchtigt sind, ausreicht, um die gesamte Funktion des Gewebes zu beeinflussen (Wiesner et al., 2006). Die Klonalität der Mutationen spricht gegen die Theorie der fortlaufenden Entstehung neuer Mutationen. Sie zeigt aber auch, dass, wenn einmal eine Mutation entstanden ist, keine weiteren neuen Mutationsereignisse gebraucht werden, um die Mutationslast der Zelle signifikant zu verändern (Wiesner et al., 2006).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Häufigkeit und Charakterisierung von Heteroplasmie in der gesamten Kontrollregion der humanen mtDNA in postmitotischem Gewebe von Muskel und Gehirn. Dafür benötigten wir ein Screeningverfahren, welches sensitiv genug ist, die heteroplasmischen Mutationen zu detektieren, und, das gleichzeitig in einem zeitlich und finanziell angemessenen Rahmen durchführbar war. Die Kontrollregion wurde auf Grund des hohen Maßes an Variabilität ausgewählt und der dementsprechend höheren Chance, dort Heteroplasmie vorzufinden (Coller et al., 2002). Bei der Charakterisierung der heteroplasmischen Mutationen sollte vor allen Dingen die Frage geklärt werden, ob es sich um somatische oder vererbte Mutationen handelt. Dazu wurden der Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad und die Gewebsspezifität der Heteroplasmien ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit denen der Literatur verglichen und diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acetonitrile	Sigma-Aldrich, Hannover
Agarose	Sigma-Aldrich, Hannover
Akrylamid (40 %)	Bio-Rad, Hamburg
APS	Sigma-Aldrich, Hannover
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Hannover
EDTA	Sigma-Aldrich, Hannover
Ethanol (100 %)	Sigma-Aldrich, Hannover
Ethanol (70 %)	Sigma-Aldrich, Hannover
Ethanol (96 %)	Sigma-Aldrich, Hannover
flüssig Stickstoff	Linde AG, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Hannover
KCl	Sigma-Aldrich, Hannover
KHCO ₃	Sigma-Aldrich, Hannover
Mili-Q-Wasser	Sigma-Aldrich, Hannover
NaCl	Sigma-Aldrich, Hannover
NaOH	Sigma-Aldrich, Hannover
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, Hannover
PCR-Wasser	Sigma-Aldrich, Hamburg
SDS	Sigma-Aldrich, Hannover
10.000 x SybrGreen-Lösung	Sigma-Aldrich, Hannover
TEAA	Sigma-Aldrich, Hannover
TEMED	Sigma-Aldrich, Hannover
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Hannover

2.1.2 Puffer und Lösungen

10 x TAE-Puffer	Sigma-Aldrich, Hannover
10 x TBE-Puffer	Sigma-Aldrich, Hannover
TE-Puffer	Sigma-Aldrich, Hannover
Gel-lade-Puffer	Sigma-Aldrich, Hannover
Ethidium-Bromid-Stammlösung	Sigma-Aldrich, Hannover
5molarer NaCl-Lösung	Sigma-Aldrich, Hannover
0,15 molare KCL-Lösung	Sigma-Aldrich, Hannover
SDS (10 %)	Sigma-Aldrich, Hannover
Taq-Puffer	Sigma-Aldrich, Hamburg
AccuTaq-Puffer	Invitrogen, Kalsruhe
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Hamburg
dNTP)	Bio-Rad, Hamburg
Puffer A	Mili-Q-Wasser, 5 % TEAA; 2,5 % Acetonnitroil
Puffer B	Mili-Q-Wasser, 5 % TEAA; 25 % Acetonitril
Puffer C	Mili-Q-Wasser, 75 % Acetonitril
Puffer D	Mili-Q-Wasser, 8 % Acetonitril
Lysispuffer	Mili-Q-Wasser, 155mM NH ₄ Cl, 10mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA, mit NaOH auf PH 7,4
SE-Puffer	Mili-Q-Wasser , 75mM NaCl, 25mM EDTA, mit NaOH auf pH 8 einstellen
Ladepuffer	Mili-Q-Wasser, 15 % Ficoll, 60mM EDTA (pH 8), eine Spatelspitze je Xylencyanol und Bromphenolblau

2.1.3 Kits

QIAquick PCR-Purifikation Kit, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH Deutschland)

2.1.4 Enzyme, Primer und Marker

Proteinkinase K	Quiagen, Hilden
JumpStart-Accu-Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Taq-Polymerase	Invitrogen, Kalsruhe
1kb Größenmarker	Invitrogen, Kalsruhe
25bp Größenmarker	Invitrogen, Kalsruhe
Mutationstandard I	Transgenomic, Cambridge
Mutationstandard II	Transgenomic, Cambridge
DL1up	Thermo Fisher Scientific, Waltham
DL1low	Thermo Fisher Scientific, Waltham
DL2up	Thermo Fisher Scientific, Waltham
DL2low	Thermo Fisher Scientific, Waltham

2.1.5 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Gelkammer	Bio-Rad, München
Magnetrührer	VELP Scientifica, Mailand
PCR-Maschine	MJ Research, Waltham
Schüttelplattform	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle	Bio-Rad, München
UV-Illuminator	Bio-Rad, München
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Wave Nucleic Acid Research System	Transgenomic, Cambridge
DNASep® Column	Transgenomic, Cambridge
pH-Meter und Elektrode	WTW, Weilheim

Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filter-Tips	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Dahlhausen, Köln
Handschuhe	Ansell, Richmond
Messbecher	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Gerät	Heidolph, Schwabach

2.1.6 Software

ClustalX2.0	European Bioinformatic Institute, Dublin	zum Angleichen von Sequenzen von PCR-Produkten an die der mtDNA
Instat 3	GraphPad, San Diego	für statistische Auswertungen
QuantityOne 4.5.2	Bio-Rad, München	zur Auswertung und graphischen Darstellung von Gelen
Reference Manager 11	Thomson, Stamford	zur Erstellung von Zitaten und des Literaturverzeichnisses
SigmaPlot 2001	Systat Software Inc, San Jose	zur Erstellung von Graphiken
Stata 10	Stata Corp., Lakeway	für statistische Auswertungen und zur Erstellung von Graphiken
Wave Maker 4.0	Transgenomic, Cambridge	zur Bestimmung der optimalen Schmelztemperatur für die DHPLC-Analyse

2.1.7 Proben

Für das Screening wurden humanes Gehirn- und Muskelgewebe verwendet. Alle Muskelproben stammten von nicht verwandten Patienten der neurologischen Klinik der Universität Bonn. Zum Zeitpunkt der Biopsie waren die Patienten durchschnittlich 40 Jahre alt (+ / - 20 SD). Die Gehirnproben stammen von nicht verwandten Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie, deren Hippocampi einseitig durch neurochirurgische Eingriffe entfernt wurden. Zum Zeitpunkt des neurochirurgischen Eingriffs waren die

Patienten im Durchschnitt 35 Jahre alt (+ / - 15 SD). Das Gehirn- und Muskelgewebe wurde bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Von den Patienten wurden darüber hinaus, sofern vorhanden, Blut- und / oder Urinproben untersucht. Die Studie wurde gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Bonn durchgeführt und von jedem Individuum wurden Einverständniserklärungen eingeholt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung (Muskel, Gehirn, Blut, Urin)

Totale DNA wurde aus in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrttem Gehirn- und Muskelgewebe sowie aus frischen EDTA-Blut- und Urinproben isoliert. Die EDTA-Blut- und Urinproben wurden nach Entnahme bis zur Isolierung bei 4 °C aufbewahrt. Die Methoden sind im Folgenden aufgeführt.

DNA-Isolierung aus Gehirn- und Muskelgewebe

Aus Gehirn- und Muskelgewebe wurde totale DNA mit Hilfe des QIAamp Mini Kit nach modifiziertem Herstellerprotokoll isoliert. Die Volumenangaben beziehen sich auf ca. 20 mg Gewebe. Zunächst wurden die zellulären Proteine mit Hilfe der Proteinase K verdaut und die freigewordene DNA wurde während der Zentrifugation an der Silika-Gelmembran einer Säule gebunden. Die gebundene DNA wurde in mehreren Schritten von Kontaminationen gereinigt und schließlich mit einem Extraktionspuffer wieder von der Säule gelöst.

1. Lyse der Zellen mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (20 mg / ml) Platzierung des Gewebsstückes in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß, Inkubation über Nacht bei 56 °C in der Schüttelplattform
2. Inaktivierung der Proteinase K mit 200 µl Puffer AL Inkubation für 10 min bei 70 °C in der Schüttelplattform
3. Fällung der DNA durch Zugabe von 200 µl Ethanol (96 %) Überführung auf eine Säule

- | | |
|---|---|
| 4. Retention der DNA durch Binden an die Säulenmatrix | Zentrifugation (8000 rpm, 1 min)
verwerfen des Eluats |
| 5. Erstes Waschen der an die Säulenmembran gebundenen DNA durch Auftragen von 500 µl Puffer AW 1 auf die Säule | Zentrifugation (8000 rpm, 1 min)
verwerfen des Eluats |
| 6. Zweites Waschen der an die Säulenmembran gebundenen DNA durch Auftragen von 500 µl Puffer AW 2 auf die Säule | Zentrifugation (13200 rpm, 1 min)
Verwerfen des Eluats |
| 7. Entfernung des Waschpuffers von der Säulenmembran | Zentrifugation (13200 rpm, 3 min)
verwerfen des Eluats |
| 8. Elution der DNA von der Säulenmembran durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer | 5 min Inkubation nach Pufferzugabe,
Zentrifugation (8000 rpm, 1 min) |

DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Die genomische DNA der Patienten mit heteroplasmischen Mutationen wurde mittels Proteinaussalzung und anschließender Ethanol-fällung aus Blut isoliert (Miller et al., 1988; Sambrook und Russell, 2001). Die Volumenangaben beziehen sich auf 10 ml EDTA-Blut.

- | | |
|---|---|
| 1. Lyse der Erythrozyten mit 30ml Lysispuffer (4 °C) in einem 50ml Falcon-Röhrchen | 30 min Inkubation auf Eis, zwischendurch mischen,
Zentrifugation (1000g, 4 °C, 10min),
verwerfen des Überstandes |
| 2. Erstes Waschen der Leukozyten in 10ml Lysispuffer (4 °C) | Leicht schwenken, nicht resuspendieren,
Zentrifugation (1000g, 4 °C, 10 min), verwerfen des Überstandes |
| 3. Zweites Waschen der Leukozyten in 10ml Lysispuffer (4 °C) und Entfernung des Hämoglobins | Leicht schwenken, nicht resuspendieren,
Zentrifugation (1000g, 4 °C, 10 min), verwerfen des Überstandes, Hämoglobin (Kranz um Pellet) leicht aufschütteln und abschütten |

- | | |
|---|--|
| 4. Drittes Waschen der Leukozyten in 10ml 0,15 molare KCl-Lösung (4 °C) | Pellet lösen, Zentrifugation (1000g, 4 °C, 10 min), Verwerfen des Überstandes |
| 5. Lyse der mononukleären Zellen mit 5ml SE-Puffer, 12,5 µl Proteinase K (10µl / ml) und 500µl 10 % SDS | Pellet lösen, Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank |
| 6. Aussalzen der Proteine mit 1,7ml 5M NaCl-Lösung (gesättigt) | 15 sec Mischen durch mehrmaliges Invertieren, Zentrifugation (5000g, 15 min), überführen des DNA-haltigen Überstandes in neues Falcon-Röhrchen |
| 7. Fällung der DNA mit 2fachem Volumen absolutem Ethanol | Einmaliges Invertieren→ DNA fällt fadenförmig aus, überführen der DNA mit einer 100µl Pipette in ein leeres 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß |
| 8. Waschen der DNA durch Zugabe von 1ml Ethanol (70 %) | Mischen durch leichtes Schnippsen (nicht resuspendieren), Überführen des fadenförmigen DNA-Pellet mit einer 100µl Pipette in ein leeres 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß |
| 9. Trocknen der DNA an der Luft (bei geöffnetem Deckel) | Nach ca. 30 min lösen der DNA je nach Größe des Pellets in 200-500µl TE-Puffer |

DNA-Isolierung aus Urin

Aus Urinproben wurde totale DNA mit Hilfe des QIAamp Mini Kit nach modifiziertem Herstellerprotokoll isoliert. Die Volumenangaben beziehen sich auf 20 ml Urin.

- | | |
|---|--|
| 1. Trennung der festen von den flüssigen Bestandteilen des Urins | Zentrifugation (4000 rpm, 30 Minuten) in einem sterilen 50ml Falcon-Gefäß
Abnehmen des Überstands |
| 2. Lösen des Pellet in 200 µl PBS-Puffer | Überführung der Suspension in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß |
| 3. Lyse der Zellen mit 200 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (20 mg / ml) | Inkubation für 10 Minuten bei 56 °C in der Schüttelplattform |
| 4. Fällung der DNA durch Zugabe von 200 µl Ethanol (96 %) | Überführung auf eine Säule |
| 5. Retention der DNA durch Binden an die Säulenmatrix | Zentrifugation (8000 rpm, 1 min)
Verwerfen des Eluats |
| 6. Erstes Waschen der an die Säulenmembran gebundenen DNA durch Auftragen von 500 µl Puffer AW 1 auf die Säule | Zentrifugation (8000 rpm, 1 min)
Verwerfen des Eluats |
| 7. Zweites Waschen der an die Säulenmembran gebundenen DNA durch Auftragen von 500 µl Puffer AW 2 auf die Säule | Zentrifugation (13200 rpm, 1 min)
Verwerfen des Eluats |
| 8. Entfernung des Waschpuffers von der Säulenmembran | Zentrifugation (13200 rpm, 3 min)
Verwerfen des Eluats |
| 9. Elution der DNA von der Säulenmembran durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer | 5 min Inkubation nach Pufferzugabe,
Zentrifugation (8000 rpm, 1 min) |

2.2.2 PCR-Amplifizierung

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen Vervielfältigung spezifischer Nukleotidbasensequenzen, welche mit Hilfe eines hitzestabilen Enzyms (DNA-Polymerase) und zweier spezifischer Oligonukleotide (Primern) amplifiziert werden (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985). Im ersten Schritt werden die DNA Doppelstränge durch Hitze bei 92-96 °C von einander getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt lagern sich die beiden Primer bei einer Temperatur zwischen 55-72 Grad Celsius an den komplementären einsträngigen DNA-Abschnitt, die sogenannte Matrize (Annealing). Anschließend werden die Primer bei 72 °C unter Einbau freier dNTPs von der DNA-Polymerase komplementär zum vorliegenden Matrizenstrang in 5'-3'-Richtung verlängert (Extension). Die drei Schritte werden mehrfach wiederholt. Die neusynthetisierten DNA Doppelstränge, welche sich jeweils aus einem alten und einem komplementären neuen Strang zusammensetzten, dienen in den folgenden Zyklen als Matrize. Auf diese Weise wird die Anzahl der DNA-Fragmente zwischen den Primern bei jedem Durchlauf ca. verdoppelt.

Verwendete Primer

DL1up (m.15974) ACTCCACCATTAGCACCCAAAGC

DL1low (m.45) TGGAGAGCTCCCGTGAGTGGTT

DL2up (m.16520) CATAAAGCCTAAATAGCCCACACG

DL2low (m.638) GGTGATGTGAGCCCGTCTAAAC

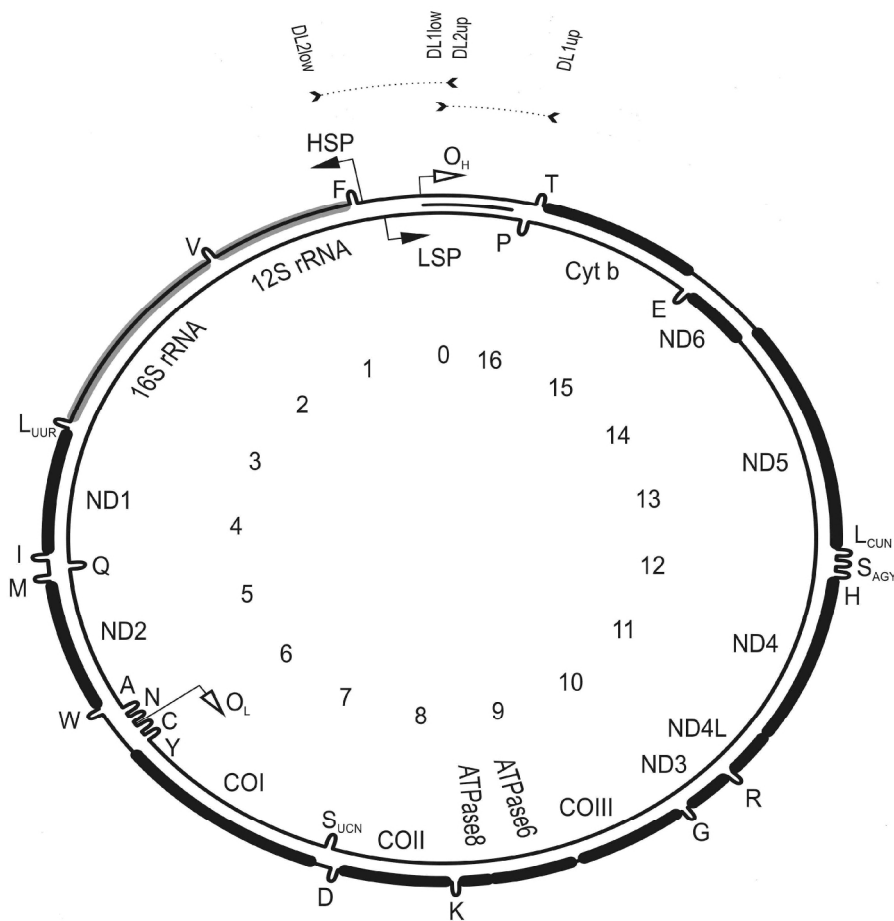


Abb. 5: Schematische Darstellung der mitochondriale DNA und der verwendeten Primer (www.mitowheel.org)

PCR-Reaktionsansätze

Die PCR-Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten und wurden unter den nebenstehenden Reaktionsbedingungen durchgeführt.

PCR-Reaktionansatz 1		PCR-Programm 1			
Komponente [Konzentration]	Volumen	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
JumpStart AccuTaq-Polymerase	0,25 µl	Denaturierung	96 °C	30 s	
Taq 10 x Puffer	2,5 µl	Denaturierung	94 °C	20 s	10
MgCl ₂	1,5 µl	Annealing und	63 °C	2:50 min	
dNTP Mix	2 µl	Elongation			
DL1up [25 pmol / µl]	0,4 µl	Denaturierung	92 °C	25 s	25
DL1low [25 pmol / µl]	0,4 µl	Annealing und	68 °C	3 min	
DNA	1 µl	Elongation			

H ₂ O des.	16,95 µl	Elongation	72 °C	1 min
Gesamtvolumen	25 µl	Denaturierung	95 °C	5 min
		Renaturierung	4 °C	∞

Tab.1: Übersicht der Einzelkomponenten der PCR-Amplifikation des DNA-Abschnittes D-Loop1 und die verwendeten Reaktionsbedingungen

PCR-Reaktionansatz 2		PCR-Programm 2			
Komponente [Konzentration]	Volumen	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
JumpStart AccuTaq-Polymerase	0,25 µl	Denaturierung	96 °C	30 s	
Taq 10 x Puffer	2,5 µl	Denaturierung	94 °C	20 s	10
MgCl ₂	2,5 µl	Annealing und	72 °C	2:50 min	
dNTP Mix	1,5 µl	Elongation			
DL2up [25 pmol / µl]	0,4 µl	Denaturierung	92 °C	25 s	25
DL2low [25 pmol / µl]	0,4 µl	Annealing und	72 °C	3 min	
DNA	1 µl	Elongation			
H ₂ O des.	16,45 µl	Elongation	72 °C	1 min	
Gesamtvolumen	25 µl	Denaturierung	95 °C	5 min	
		Renaturierung	4 °C	∞	

Tab. 2: Übersicht der Einzelkomponenten der PCR-Amplifikation des DNA-Abschnittes D-Loop2 und die verwendeten Reaktionsbedingungen

Das verwendete Enzym JumpStart AccuTaq (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein Gemisch aus DNA-Polymerasen mit und ohne 3'-5' Exonukleaseaktivität (proofreading Aktivität). Sie wurde verwendet, um die Fehlerquote während der Amplifikation möglichst klein zu halten. Zusätzlich enthält die Mischung einen hitzelabilen Antikörper, der die Polymerasen bei Raumtemperatur inhibiert und so unspezifische Anlagerungen der Primer bei suboptimalen Temperaturen vermieden werden.

Das Temperatur-Optimum der DNA-Polymerase liegt bei ca. 72 °C, allerdings ist sie auch bei niedrigeren Temperaturen aktiv, weshalb in dem PCR-Programm Annealing und Extension bei demselben Intervall stattfinden. Die optimale Annealing-Temperatur für PCR-Programm 2 wurde mittels Gradient PCR und Polyakrylamidgel-Elektrophorese

ermittelt. Als Negativ-Kontrolle zum Ausschluss von Kontamination wurde bei jedem Ansatz eine PCR Reaktion ohne DNA durchgeführt.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Alle PCR Produkte wurden nach Ablauf der PCR in einem Kühlschrank bei 4 °C gelagert und zur Überprüfung auf ihre Spezifität (Qualität) und Menge (Quantität) auf ein 1 % Agarose-Gel aufgetragen.

Die jeweilige Agarosemenge wurde abgewogen und in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Anschließend wurden für je 60 ml Gel 3µl Ethidium-Bromidstammlösung hinzugegeben und die Lösung in die Gelkammer gegossen. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid macht die DNA durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Gelkammer in die Elektrophoresekammer gelegt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE Puffer verwendet. 3µl PCR-Produkt wurden mit jeweils 3µl loading buffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde 1kb ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 20 Minuten bei 100 Volt. Zur Dokumentation wurde das Gel am Transilluminator unter UV-Licht fotografiert (Geldoc). Die Konzentration der DNA kann durch Vergleich mit dem Standard abgeschätzt werden. Ein sauberes Produkt zeichnet sich durch eine scharfe Bande aus.

2.2.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Verbesserung der PCR Spezifität wurde die optimale Annealing-Temperatur für das Primerpaar DL2up und DL2low an Hand einer Gradienten-PCR und einer Polyakrylamidgel-Elektrophorese ermittelt. Für die Gradienten-PCR wurden die Polyacrylamidgele den Agarosegelen auf Grund der höheren Auflösung vorgezogen (Sambrook und Russell, 2001).

Vor der Elektrophorese wurden die Gele durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Acrylamid-Monomere polymerisieren unter dem Einfluss freier Radikale zu langen Ketten. N,N'-Methylenbisacrylamide formen Quervernetzungen und bilden auf diese Weise ein dreidimensionales Gelnetz. APS (Ammoniumpersulfat) zerfällt zu Sulfatradikalen und startet durch das Aufbrechen der Acrylamid-Doppelbindungen die

Polymerisationsreaktion. TEMED (Tetramethylethyldiamin) stabilisiert die freien Radikale und wirkt somit als Katalysator. Die Porengrößen des Gels werden durch die Länge der Ketten und Menge der Quervernetzungen, die während der Polymerisierung entstehen und von der Acrylamidkonzentration abhängen, bestimmt. Folglich hängt die Trennleistung des Gels von seiner Acrylamidkonzentration ab. Die Gel-Mischung (siehe Tabelle 3) wurde zwischen zwei abgedichteten Glasplatten pipetiert, welche durch einen Abstandhalter, der an einer der beiden verwendeten Glasplatten sitzt, von einander getrennt sind. Dann wurde zur Bildung der Taschen ein Kunststoffkamm auf die Apparatur gesetzt. Dabei durften keine Bläschen, die die Trennung beeinträchtigen könnten, verbleiben. Wegen der Toxizität des Acrylamid erfolgte der Versuchsaufbau unter Verwendung von Handschuhen. Nach ca. 30-60 Minuten waren die Gele auspolymerisiert und die Trennung konnte gestartet werden. Der Kamm wurde abgesetzt und das Gel wurde mitsamt der Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte eine Stunde bei 0,2 mA pro Gel. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasscheiben getrennt und 30 Minuten 1 x TBE-Puffer mit 1 x SyBRGreen-Lösung gefärbt, bevor es unter dem UV-Illuminator ausgewertet wurde.

Bestandteile	Menge in ml für 10ml Gel
Acrylamid 40 %	2,5
TBE-Puffer (5 x)	2
H ₂ O	5,4
APS 10 %	0,1
TEMED	0,01

Tab. 3: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels

2.2.5 DHPLC-Analyse

Zur Detektion heteroplasmischer Mutationen in der Kontrollregion der mitochondrialen DNA wurde das Wave-System verwendet. DHPLC (denaturing high performance liquide chromatography, Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie) beruht auf der von einander abweichenden Migrationsgeschwindigkeit von DNA-Homo- und

Heteroduplices durch die Matrix einer Trennsäule (Oefner und Underhill, 1995). In einer mobilen Phase binden die DNA-Moleküle an der Säule, welche aus einer hydrophoben Polymermatrix besteht. Indem sich hydrophobe Ammonium-Kationen des TEAA (Triethylammoniumacetat) im Laufpuffer an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA anlagern und die Alkylgruppen des TEAA an die Oberfläche der Polymermatrix binden, werden die DNA-Moleküle an die Säule gebunden. Die Nukleinsäuren werden durch eine kontinuierliche Erhöhung der Acetonitrilkonzentration (Umkehrphasen-Chromatographie) wieder von der Säule gelöst und durch einen UV-Detektor gemessen (Absorption 254nm). Im nicht denaturiertem Zustand erfolgt eine Trennung der DNA-Moleküle weitgehend nach Fragmentlänge, daher werden längere Fragmente später von der Säule eluiert als kürzere (Oefner und Huber, 2002). Für die Mutationsanalyse wird ein Verfahren benötigt, bei dem DNA-Fragmente identischer Länge, aber mit unterschiedlicher Basenzusammensetzung getrennt werden. Dafür werden die DNA-Moleküle zunächst denaturiert und wieder renaturiert. Bei der Denaturierung trennen sich die Einzelstränge voneinander. Wenn das PCR-Produkt eine Mischung aus Wildtyp (**WW**) und Mutant (**MM**) beinhaltet, kommt es bei der Renaturierung zur Bildung von vier DNA-Duplices: die beiden Homoduplices **WW** und **MM** sowie zwei neu entstandene Heteroduplices **WM**, **MW**, welche an einer Position ein nicht komplementäres Basenpaar tragen. (normal gedruckt „Leichter Strang“, dickgedruckt „Schwerer Strang“) (siehe Abbildung 6 oben) (Wulfert et al., 2006). Auf Grund der unterschiedlichen Basenzusammensetzung unterscheiden sich die Schmelztemperaturen der vier, wobei die Schmelztemperatur der beiden Heteroduplices auf Grund der Fehlpaarung etwas geringer ist als die der beiden Homoduplices. Bei der Temperatur, bei der die Homoduplices noch größtenteils zweisträngig, die Heteroduplices aber schon größtenteils einsträngig vorliegen (partiell denaturierende Bedingungen), haben sie unterschiedliche Bindungsaffinitäten zur Säule und lassen sich daher auch voneinander trennen. Je größer diese Unterschiede in der Bindungsaffinität, desto größer ist der zeitliche Abstand, in welchem sich die Fragmente lösen, und desto größer ist der zeitliche Abstand der einzelnen Elutionspeaks. Im Idealfall wird ein Profil mit vier Elutionspeaks erzeugt (siehe Abbildung 6 unten). Infolge struktureller Ähnlichkeiten liegen die Bindungseigenschaften der Homoduplices eng bei einander und daher verschmelzen ihre Elutionspeaks häufig, so dass weniger als vier Peaks zu sehen

sind (Xiao und Oefner, 2001). Eine heteroplasmische Mutation zeigt sich im minimalen Fall nur als Peak mit einer Schulter (Schmitt et al., 2000). In seltenen Fällen ist die Mutation überhaupt nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

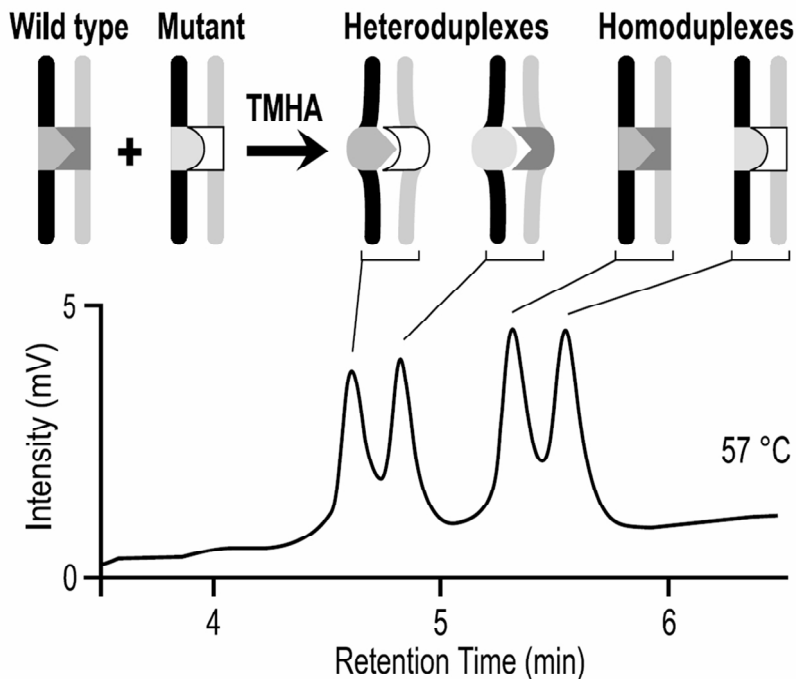


Abb. 6: Schematische Darstellung der DNA-Duplexe und des Elutionsprofils von Homo- und Heteroduplexen (Bonner 2000). TMHA steht für Temperaturmodulierte Heteroduplexanalyse

Bestimmung der optimalen Analysetemperaturen und Analysevorgang

Die für die beiden DNA-Fragmente spezifischen Schmelztemperaturintervalle wurden unter Zuhilfenahme der WAVE-Maker-Software bestimmt. Das Programm zeigt für die jeweilige Nukleinsäuresequenz des zu analysierenden PCR-Produktes eine partiell denaturierende Temperatur an, bei der das Fragment untersucht werden soll. Nach den Angaben des Herstellers stellen sich Sequenzvarianten optimal dar, wenn sich der gesamte DNA-Abschnitt noch zu 70-85 % in doppelsträngigem Zustand befindet (Schmitt et al., 2000). Sind mehrere Schmelzdomänen vorhanden, wie in den beiden Fragmenten D-Loop 1 und 2, können mehrere Temperaturen ausgesucht und gespeichert werden. Ein Diagramm zeigt das Schmelzverhalten der einzelnen Domänen der ausgewählten Temperaturen an. An Hand dieser Diagramme wurde ein

Temperaturintervall ausgewählt (56-59 °C für D-Loop1 und 57-60 °C für D-Loop2). Die optimale Analysetemperatur wurde für jedes der beiden Fragmente experimentell ermittelt und betrug 57,2 °C für D-Loop 1 und 58,3 °C für D-Loop 2.

Nach der Amplifizierung wurden die PCR-Produkte für die DHPLC-Analyse (vor der Kontrolle mittels Agarosegelelektrophorese) denaturiert (5 Minuten bei 98 °C) und zur Bildung der DNA-Duplices schrittweise abgekühlt (1 °C / Minute, von 98 °C auf 68 °C). Die PCR-Reaktionsbehälter wurden im Autosampler des Wave-Systems platziert; je nach Ausbeute der PCR betrug das Injektionsvolumen zwischen 5 und 8 µl des PCR-Produktes. Nach einer Ofenkalibrierung oder einem Pufferwechsel wurden zwei Mutationsstandard (Transgenomic) zur Überprüfung der Analysebedingungen verwendet.

2.2.6 Reinigung der PCR-Produkte

Für eine nachfolgende Sequenzierung wurden die in der DHPLC-Analyse als heteroplasmisch erscheinenden PCR-Produkte mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit aufgereinigt. Bei dieser Methode werden Amplifikate bei hoher Salzkonzentration an die Silika-Membran einer Spin-Säule gebunden, während Verunreinigungen (Salze, PCR-Primer, PCR-Pufferzusätze) die Säulenmatrix passieren und auf diese Weise entfernt werden. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA mit 40 µl EB-Puffer von der Säule eluiert. Die Aufreinigung wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

2.2.7 Sequenzierung

Im Anschluß an die Purifizierung wurden die PCR-Produkte nach der Methode von Sanger et al. (1977) mit den vorwärts gerichteten Primern DL1up und DL2up sequenziert, um die heteroplasmischen Mutationen zu verifizieren und lokalisieren (Sanger et al., 1977). Bei Vorfinden eines C-tract (Nukleotidbasensequenz aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Cytosin-Basen) in der DHPLC-Analyse wurden die PCR-Fragmente zusätzlich mit den rückwärts gerichteten Primer DL1low oder DL2low sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Alignmentprogramm ClustalX mit der korrigierten Cambridge-Referenz-Sequenz verglichen (Andrews et al., 1999). Anschließend wurden die abgeglichenen Sequenzen überprüft und eventuell vorhandene Fehler manuell verbessert. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.8 Berechnung des Heteroplasmiegrades

Die Berechnung des Heteroplasmiegrades, der prozentuale Anteil des Mutantallels der mtDNA pro Gewebeprobe, beruht auf der Beobachtung, dass Sequenzen, welche unter den gleichen Bedingungen bestimmt worden waren, im Chromatogramm ein reproduzierbares Peakmuster aufwiesen. Für die gewünschten Positionen einer Sequenz wurden die zu erwartenden Amplituden der Peaks berechnet in dem Sequenzen anderer Proben benutzt wurden, welche eindeutig homoplasmisch für das Wildtyp- oder Mutantallel waren, und in dem die Peakamplituden mit benachbarten Positionen des gleichen Nukleotid verglichen wurden (siehe Abbildung 7). Dieser Schritt wurde für alle Nukleotide dreimal jeweils für Mutant- und Wildtypallel wiederholt und ein Mittelwert gebildet. Der Heteroplasmiegrad wurde nachfolgend aus den Quotienten zwischen den Mittelwerten der tatsächlichen und der zu erwartenden Peakintensität ermittelt.

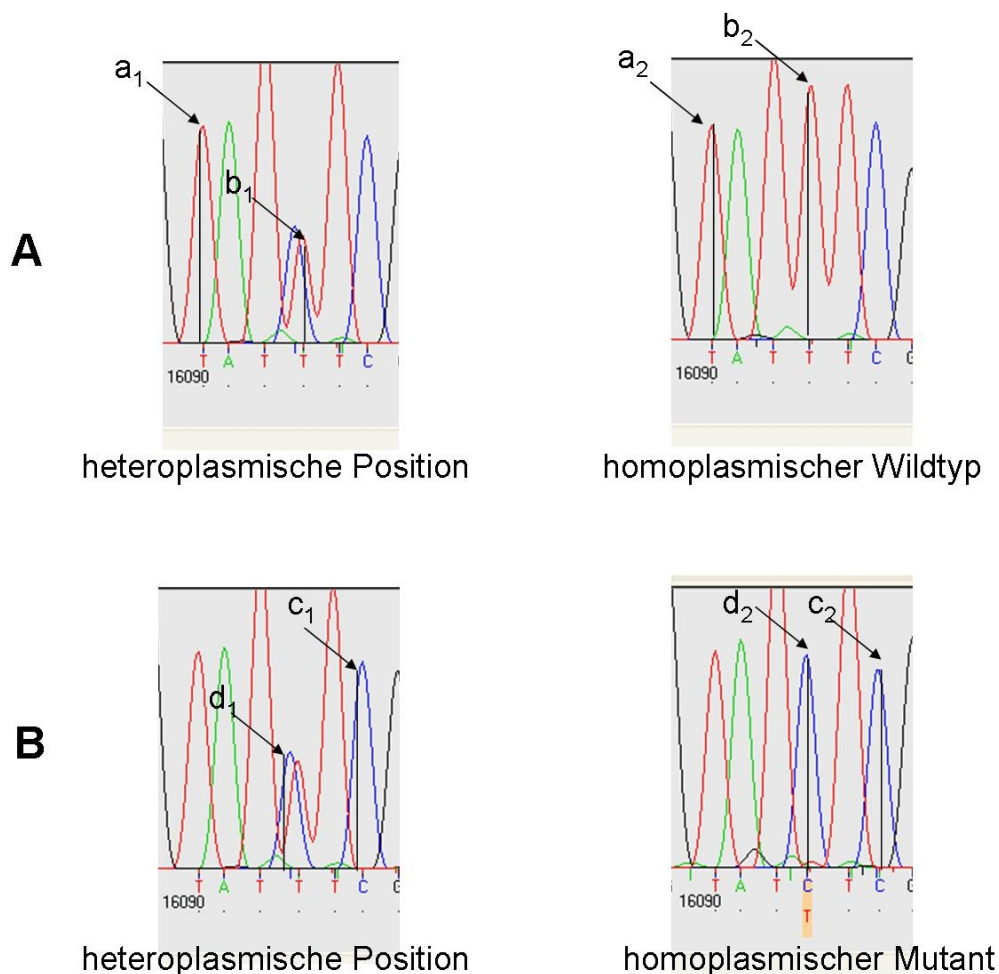


Abb. 7: Beispiel für die Berechnung des Heteroplasmiegrades

Wir maßen die Amplitude von Peak (b_1 bzw. d_1) an der heteroplasmischen Position sowie die eines benachbarten Peaks vom gleichen Nukleotid (a_1 bzw. c_1) im Sequenzierungschromatogramm. Je eine andere Probe für Wildtyp und Mutant, welche für die entsprechende Position homoplasmisch war, wurde ausgewählt und die Amplitude der korrespondierenden Peaks wurde erfasst (b_2, a_2 bzw. c_2, d_2). Anschließend wurden die zu erwartende Peakamplitude (e_w bzw. e_m) und der Heteroplasmiegrad (h_w bzw. h_m) mit Hilfe der folgenden Formeln ausgerechnet:

Für Beispiel **7A**
$$e_w = \frac{b_2 \times a_1}{a_2} \quad h_w [\%] = \left(1 - \frac{b_1}{e_w} \right) \times 100$$

Für Beispiel **7B**
$$e_m = \frac{d_2 \times c_1}{c_2} \quad h_m [\%] = \frac{d_1}{e_m} \times 100$$

2.2.9 Statistik

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Heteroplasmiehäufigkeit und dem Alter der Individuen besteht, wurden folgende Altersgruppen gebildet: Individuen unter 10 Jahre ($n = 34$), von 10 bis 19 Jahren ($n = 47$), von 20 und 29 Jahren ($n = 65$), von 30 bis 39 Jahren ($n = 95$), von 40 bis 49 ($n = 74$), von 50 bis 59 ($n = 64$), von 60 bis 69 ($n = 45$), von 70 bis 79 Jahren ($n = 14$) und über 79 Jahre ($n = 5$, wegen der geringen Anzahl der Proben von Individuen über 79 Jahren wurde die strikte Zehner-Einteilung verlassen und die Proben wurden in einer Alterskategorie zusammengefasst). Innerhalb dieser Altersgruppen wurde die Heteroplasmiehäufigkeit bestimmt und einer Regressionsanalyse unterzogen. Alle Individuen, deren Alter nicht bekannt war, wurden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Es wurden sowohl Muskel- als auch Gehirnproben verwendet. Mit Hilfe des Programms Stata 10 wurde die Regressionsanalyse für die Faktoren Alter und Gewebetyp kontrolliert durchgeführt, um mögliche Effekte der beiden Faktoren auf den jeweils anderen zu bereinigen. Zudem wurde mittels Dummy-Variablen für Alterskategorien überprüft, ob zwischen Alter und Heteroplasmiehäufigkeit ein linearer Zusammenhang besteht.

Weiterhin wurde mit dem Zweistichprobentest das Durchschnittsalter von Individuen mit spezifischen Heteroplasmien mit dem der Individuen verglichen, in denen diese Heteroplasmie nicht auftrat, um nachzusehen, ob bestimmte Mutationen in älteren häufiger vorkommen als in jüngeren Individuen.

Um zu überprüfen, ob es einen direkten Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad gibt, wurde eine nach Geweben getrennte Regressionsanalyse durchgeführt, dabei wurden alle Mutationen berücksichtigt.

Für alle Mutationen, die in sechs oder mehr Individuen vertreten waren, wurde eine nach Geweben getrennte mutationsspezifische Regressionsanalyse durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich der Heteroplasmiegrad bestimmter Mutationen anders verhält als der, der Gesamtheit aller Mutationen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Arbeit wurden heteroplasmische Mutationen der Kontrollregion humaner mitochondrialer DNA in postmitotischem Gewebe (Muskel und Gehirn) detektiert. Anschließend wurden die Mutationsgrade bestimmt und die Sequenzen den einzelnen Haplogruppen zugeordnet. Weiterhin wurden die Daten auf einen Zusammenhang zwischen Heteroplasmiehäufigkeit und Alter, sowie Heteroplasmiegrad und Alter untersucht. In Abbildung 8 sind die verwendeten Methoden der Dissertation schematisch dargestellt.

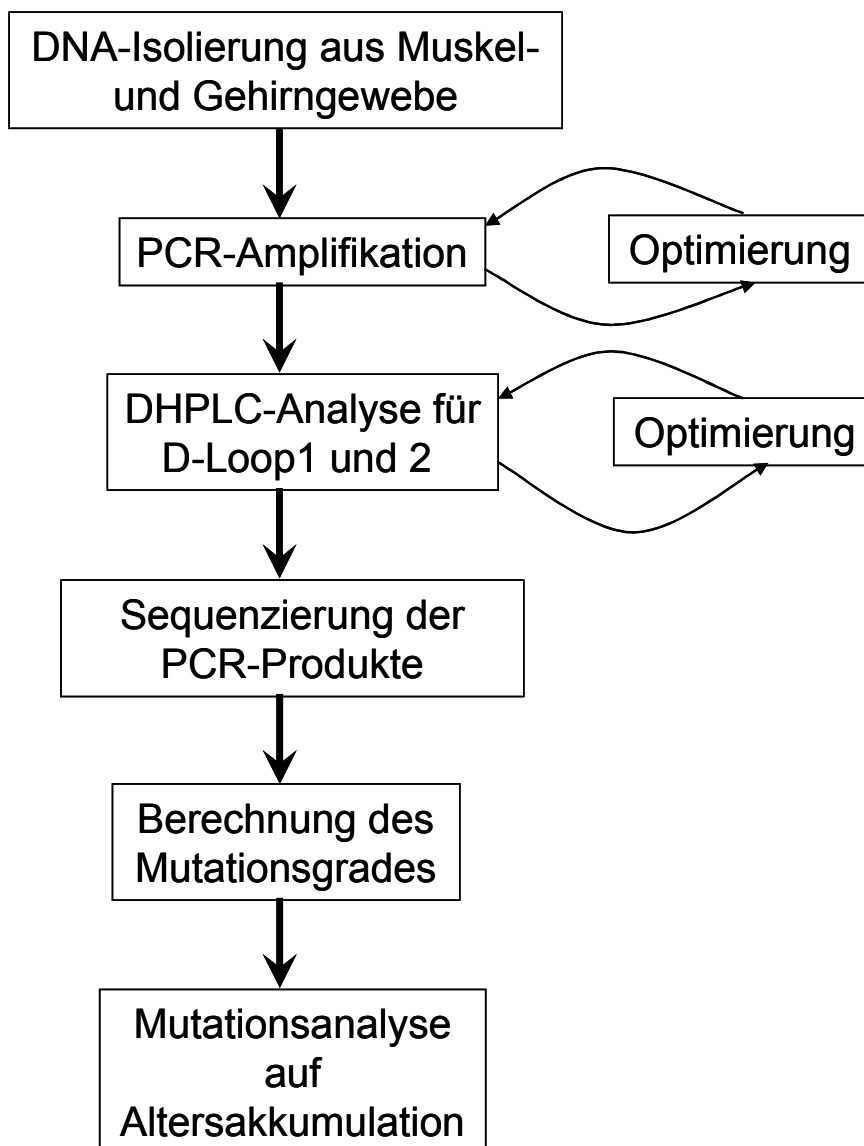


Abb. 8: Schematische Übersicht der einzelnen Projektteile dieser Arbeit

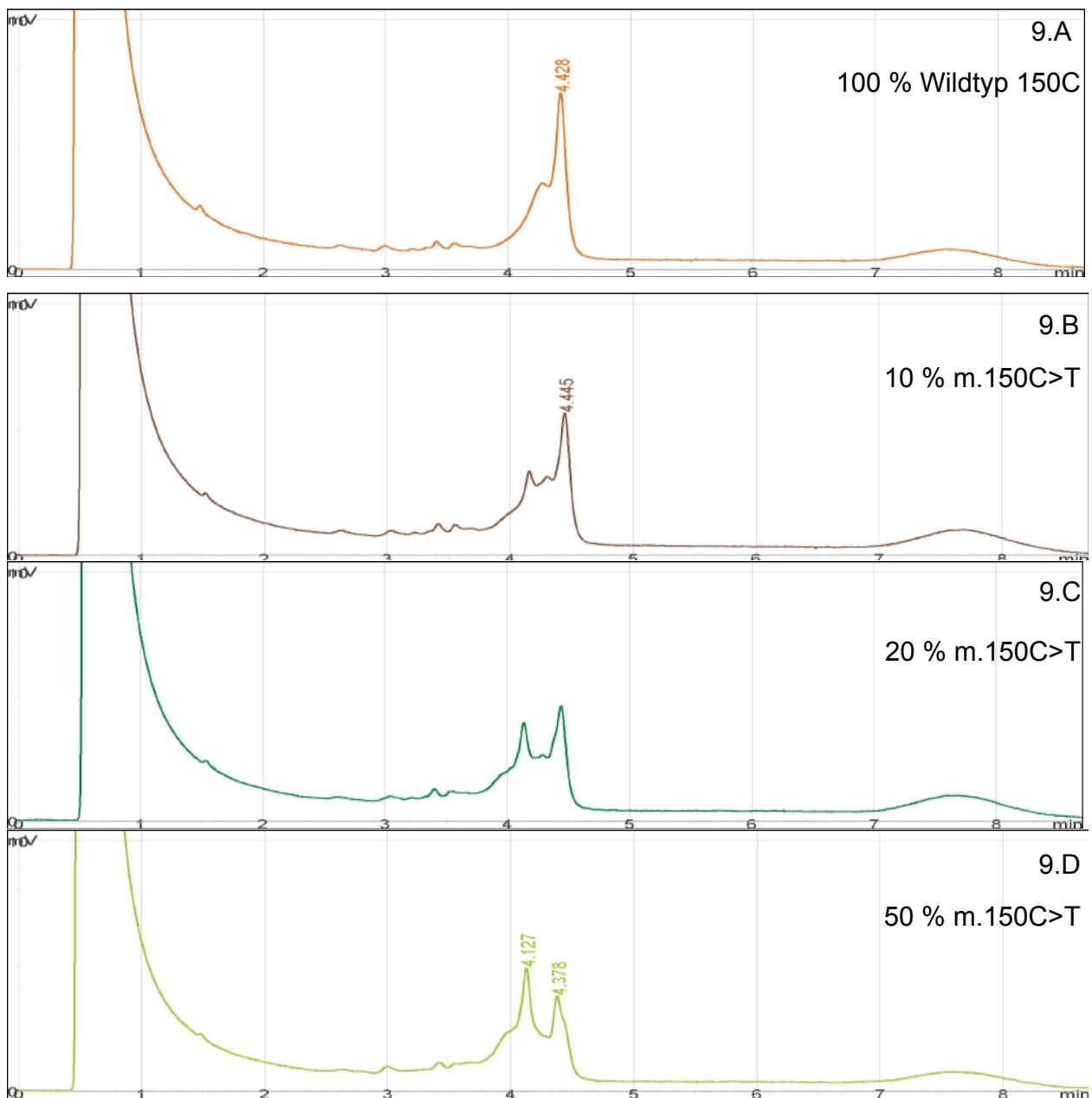
3.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Wir entwickelten eine DHPLC-Analyse zur Detektion von heteroplasmischen Mutationen in der Kontrollregion humaner mtDNA. Dazu entwarfen wir zwei Primerpaare DL1 up / low sowie DL2 up / low, deren überlappende PCR-Produkte die gesamte Kontrollregion der mtDNA abdeckten. Zur Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen wurde für die Fragmente D-Loop1 (DNA-Abschnitt zwischen den Primern DL1up und low) und D-Loop2 (DNA-Abschnitt zwischen DL2up und low) eine PCR bei einer Annealing-Temperatur von 63 °C nach dem Standard-PCR-Protokoll durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend mit Agarose-Gelelektrophorese auf Qualität (Bandenschärfe) und Quantität (Bandenbreite) überprüft. Im Fall von D-Loop2, in welchem dieses Protokoll zu unbefriedigenden Ergebnissen in der DHPLC-Analyse (breite Peaks) und der Sequenzierung (hoher Hintergrund) führte, wurde eine Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur angesetzt. Im Anschluss wurde die Gradienten-PCR mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese kontrolliert und diejenige Temperatur mit den schärfsten Banden als optimale Annealing-Temperatur festgelegt. An Hand dieses Kriteriums entschieden wir uns für eine Annealing-Temperatur für D-Loop2 von 72 °C.

3.2 Optimierung der DHPLC-Analyse

Zur Überprüfung der Detektierbarkeit von Hetroplasmien wurde für jedes der beiden DNA-Fragmente D-Loop1 und 2 ein Kontrollexperiment durchgeführt: Dazu wurden die PCR-Produkte homoplasmischer DNA-Proben bekannter Sequenz, die sich an einer Nukleotidbase des jeweiligen Abschnittes unterschieden (Position 16037 für D-Loop1 und 150 für D-Loop2), in verschiedenen Verhältnissen von 10 % zu 90 %, 20 % zu 80 %, 50 % zu 50 %, 20 % zu 80 % und 90 % zu 10 % gemischt, um diverse Heteroplasmiegrade zu simulieren und mit den beiden ungemischten homoplasmischen PCR-Produkten verglichen. Da beide DNA-Proben aus Muskelgewebe stammten, war von einer ähnlichen mtDNA Kopienzahl auszugehen. Die beiden Versuche wurden mit zwei unterschiedlichen Schmelztemperaturen durchgeführt, welche innerhalb des mit Hilfe des Wavemakers berechneten Temperaturintervalls lagen (57,5 °C und 59 °C für D-Loop1 sowie 58,2 °C und 55 °C für D-Loop2). In der Abwesenheit von Heteroplasmie zeigt das Chromatogramm unabhängig von der Sequenz nur einen einzelnen

Homoduplexpeak mit einer Schulter, während eine heteroplasmische Mutation zu zwei Peaks führt, der erste repräsentiert die Heteroduplexes und der zweite die Homoduplexes. Die Größe der Heteroduplexpeaks korreliert dabei mit dem Mutationsgrad. Bei den Schmelztemperaturen 57,5 °C für D-Loop1 und 58,2 °C für D-Loop2 konnten je alle fünf gemischten heteroplasmischen Proben von den ungemischten homoplasmischen Proben unterschieden werden (siehe Abbildung 9). Folglich war der Schwellenwert 10 % oder niedriger für diese beiden spezifischen Positionen.



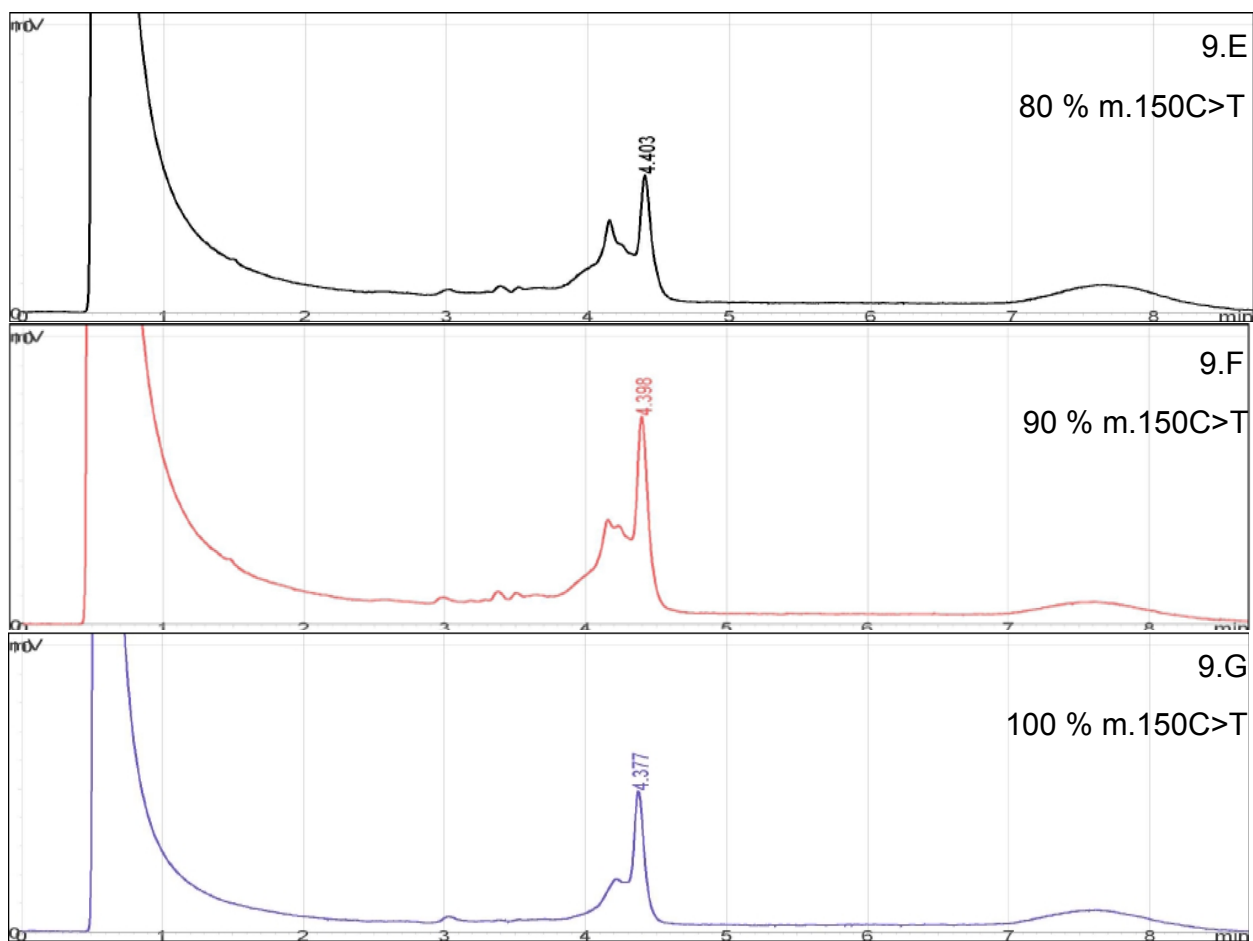


Abb. 9: zeigt die Ergebnisse des Kontrollexperiments für D-Loop2 bei einer Schmelztemperatur von 58,2 °C. Die Sequenzen beider Proben A und B waren bis auf die Nukleotidbasen an Position 150 identisch (durch Sequenzierung bestätigt). Probe A (Abbildung 9.A) trug den „Wildtyp“ 150C und Probe B (Abbildung 9.G) den Mutant m.150C>T. In den Abbildungen 9.B bis 9.F ist die DHPLC-Analyse der unterschiedlichen Mischungsverhältnisse zu sehen: 9.B 90 %: 10 %, 9.C 80 %: 20 %, 9.D 50 %: 50 %, 9.E 20 %: 80 % und 9.F 10 %: 90 %.

Im Folgenden wurden 341 Proben im D-Loop1, darunter 191 Muskel- sowie 150 Gehirnprouben, und 375 im D-Loop2, darunter 199 Muskel- sowie 176 Gehirnprouben, mit Hilfe der DHPLC-Analyse untersucht. Davon zeigten sich 49 der Proben im D-Loop1 und 54 im D-Loop2 als Heteroduplices (siehe Tabelle 4). In 92 % der Proben mit Heteroduplices im D-Loop1 und 91 % im D-Loop2 wurden in der Sequenzierung heteroplasmische Mutationen detektiert. Darüber hinaus fanden wir in 17 Muskelproben und in 22 Gehirnprouben im D-Loop1 einen Peak mit einer charakteristischen Form

(siehe Abbildung 10). Bei dieser Konfiguration handelte es sich um einen sogenannten C-Tract Polymorphismus, welcher durch eine T- zu C-Transition an Position 16189 zustande kommt und aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Cytosin-Basen besteht (durch Sequenzierung bestätigt).

	Homoduplices	Heteroduplices	C-Tract	Gesamt
D-Loop 1	253	49 (45*)	39 (39*)	341
D-Loop 2	321	54 (49*)	-	375

* durch Sequenzierung verifiziert.

Tab. 4: Ergebnisse der DHPLC-Analyse

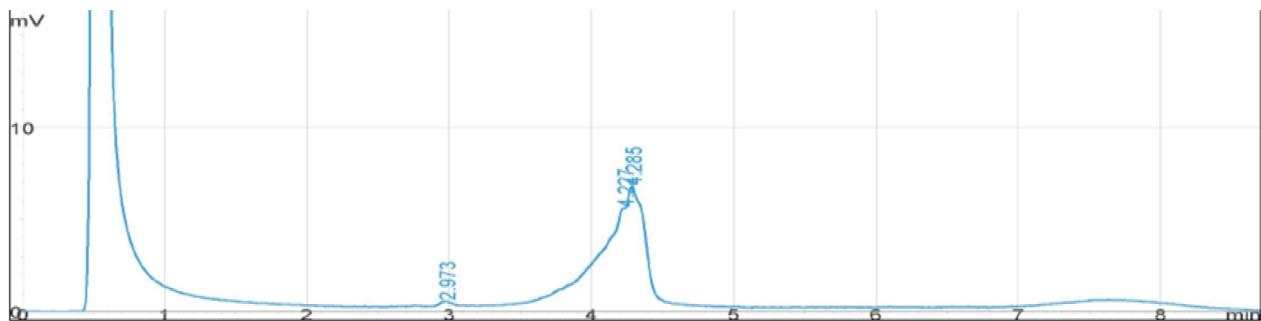


Abb. 10: DHPLC-Profil eines C-Tract-Polymorphismus

3.3 Mutationsspektrum im postmitotischen Gewebe

Im Anschluss an die DHPLC-Analyse wurden die PCR-Produkte nach der Methode von Sanger et al. (1977) mit den vorwärts gerichteten Primern DL1up und DL2up sequenziert, um die heteroplasmischen Mutationen zu verifizieren und zu lokalisieren. Die Ergebnisse der DHPLC-Analyse wurden mit den Sequenzierungsergebnissen aus unserer Datenbank vervollständigt und mit der korrigierten Cambridge-Referenz-Sequenz verglichen (Andrews et al., 1999). Es wurden 464 Proben ausgewertet, davon 285 Muskel- und 179 Gehirnproben. Die meisten Sequenzen wiesen einen Hintergrund zwischen ein und fünf Prozent auf. Sequenzen mit höherem Hintergrund wurden resequenziert, bis ein entsprechendes Ergebnis erzielt wurde, oder aus der Statistik entfernt. In der Statistik wurden ausschließlich Punktmutationen mit Heteroplasmiegraden zwischen 5 und 95 Prozent aufgeführt, um die Heteroplasmien von Sequenzierungsartefakten abzugrenzen. In insgesamt 119 der Proben wurden

Heteroplasmien gefunden, was eine Häufigkeit von 26 % im postmitotischen Gewebe ergibt. 42 Proben trugen mehr als eine heteroplasmische Mutation, das sind 9 %. Im Allgemeinen war der Heteroplasmiegrad (das Allel mit dem niedrigeren Anteil) im Muskelgewebe höher als im Gehirngewebe. Die Heteroplasmiehäufigkeit und Diversität war ebenfalls in Muskelproben größer als in Gehirnproben (siehe Abbildung 11 und 12). Heteroplasmien an Positionen 16086, 16093, 16129, 16297, 152, 185, 189, 195 und 200 wurden in beiden Geweben gefunden, wobei die Mutation m.189A>G mit 12 % gegenüber 3 % signifikant häufiger im Muskel- als Gehirngewebe vorkam. Auch die Heteroplasmie m.72T>C trat mit 7 % gegenüber 0 % signifikant häufiger im Muskel- als im Gehirngewebe auf.

3.3.1 Punktmutationen

Mutationsspektrum im Muskelgewebe

In den Muskelproben wurden heteroplasmische Punktmutationen an 43 verschiedenen Positionen mit unterschiedlichen Mutationsgraden über fast den gesamten D-Loop von Position 16048 in der HVR I bis 564, welche innerhalb des Promotors des Führungsstranges liegt, detektiert, darunter fünf Transversionen und 38 Transitionen (siehe Abbildung 11). 10 Positionen zeigten Heteroplasmie in mehr als einem Individuum. Positionen 16086, 73, 152 und 178 wurden jeweils in zwei, Position 16129 in drei und Position 67 in vier Individuen entdeckt. Besonders häufig wurden Heteroplasmien an den Positionen 16093, 183, 185 und 189 angetroffen: Position 183 war sechsmal, Position 185 achtmal, Position 16093 elfmal, Position 72 zwanzigmal und Position 189 fünfundreißigmal heteroplasmisch. Heteroplasmische Punktmutationen wurden in 87 der 285 Muskelproben detektiert, das entspricht einer Häufigkeit von 31 %. In 28 Individuen wurden zwei und in fünf Individuen drei verschiedene Heteroplasmien gefunden. Folglich besitzen 12 % der untersuchten Muskelproben mehr als eine Heteroplasmie in der Kontrollregion der mtDNA.

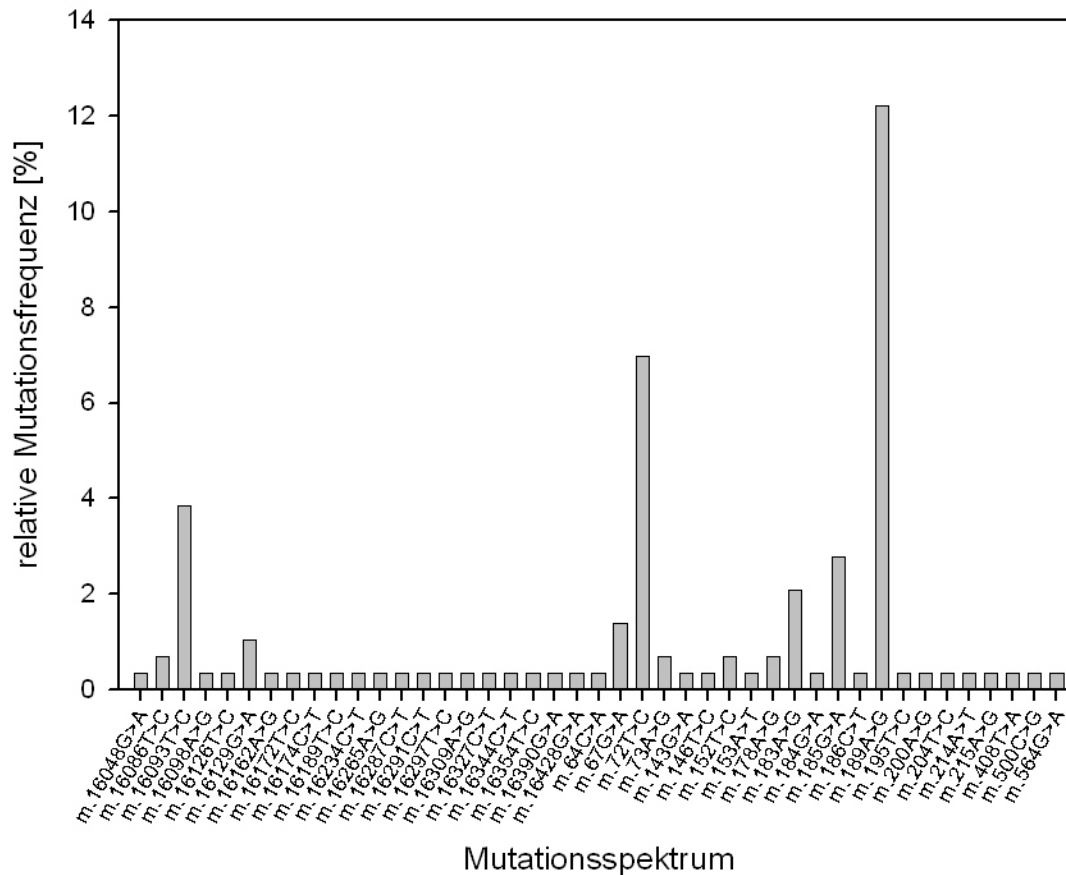


Abb. 11: Allelfrequenz im Muskelgewebe

Mutationsspektrum im Gehirngewebe

In den Gehirnprouben wurden an 21 unterschiedlichen Positionen der mitochondrialen Kontrollregion von Position 16086 bis 227 heteroplasmische Mutationen gefunden, darunter zwei Transversionen und 19 Transitionen (siehe Abbildung 12). Vier Positionen zeigten Heteroplasmien in mehr als einem Individuum: Position 16129 wurde in drei, 189 in sechs, 185 in sieben und 16093 in acht verschiedenen Individuen angetroffen. Es wurden in 32 der 179 Gehirnbipsien Heteroplasmien detektiert, was eine Häufigkeit von 18 % ergibt. In neun Personen fanden wir Heteroplasmien an zwei verschiedenen Stellen, das entspricht 5 % der Gehirnprouben.

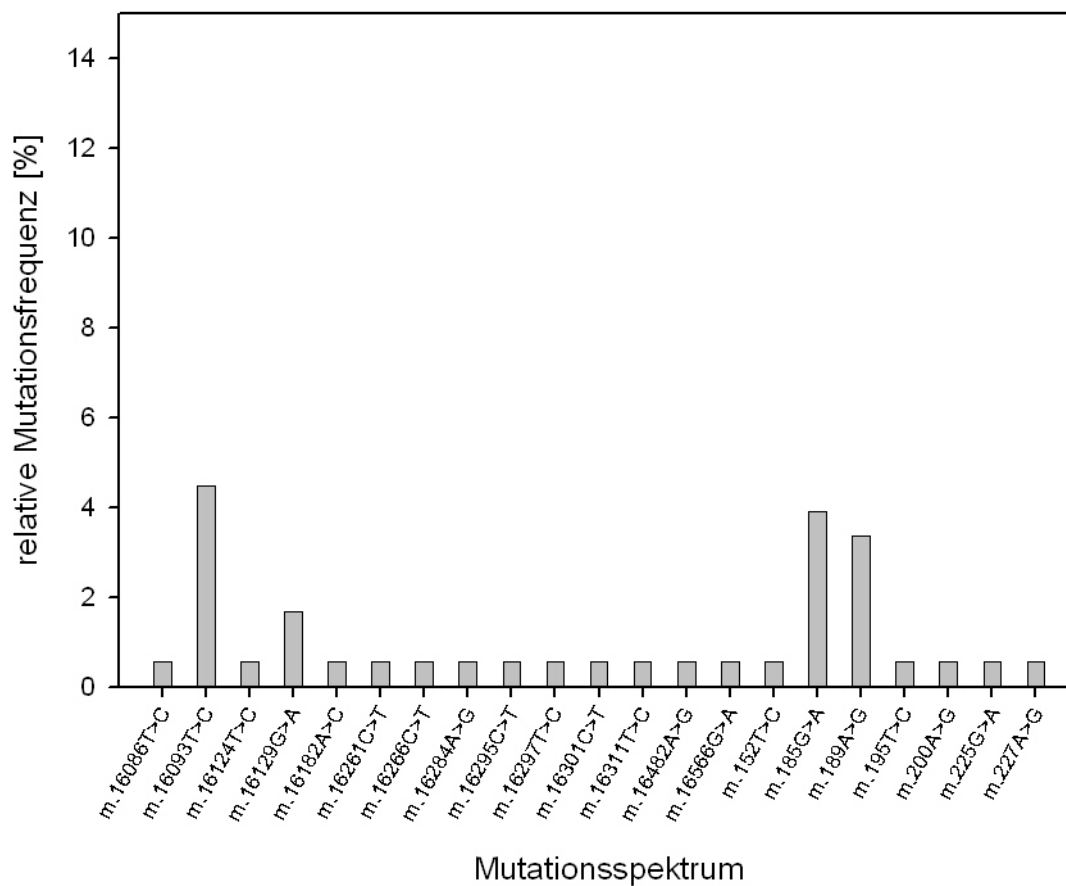


Abb.12: Allelfrequenz im Gehirngewebe

3.3.2 Längenpolymorphismen

Im Muskelgewebe wurden fünf verschiedene heteroplasmische Längenpolymorphismen entdeckt: die Insertion m.16183InsA, m.16192InsC, m.16255InsC sowie die Insertion von einer oder mehreren Cytosinbasen an Position 303 und die Deletion m.71DelG (siehe Tabelle 5). Weiterhin trat in 10 % der Fälle ein C-Tract-Polymorphismus auf, welcher durch eine T zu C Transition an Position 16189 zustande kam und aus einer komplexen Mischung von Allelen mit unterschiedlicher Cytosinzahl bestand (siehe Abbildung 10). Im Gehirngewebe wurden zwei unterschiedliche heteroplasmische Längenpolymorphismen detektiert: Die Deletion m.71DelG sowie die Insertion von einer

oder mehreren Cytosinbasen an Position 303 (siehe Tabelle 5). Außerdem wurden in 16 % der Individuen der C-Tract-Polymorphismus, welcher durch die Substitution m.16189T>C (siehe Abbildung 13) und in 1,5 % der C-Tract-Polymorphismus, welcher durch die Substitution m.310T>C entstand (siehe Abbildung 14), gefunden.

Mutation	Häufigkeit der Heteroplasmien in nicht verwandten Muskelproben [%] (Probenumfang)	Häufigkeit der Heteroplasmien in nicht verwandten Gehirnproben [%] (Probenumfang)
m.16183InsA	0,4 (285) ¹	0 (179) ¹
m.16192InsT	0,7 (285) ¹	0 (179) ¹
m.16255InsC	0,4 (285) ¹	0 (179) ¹
m.71DelG	1,1 (285) ¹	0,6 (179) ¹
m.303InsC ³	43,3 (157) ²	52,3 (65) ²

¹ ermittelt über DHPLC und / oder Sequenzierung

² ermittelt über Sequenzierung

³ komplexe Mischung aus Wildtypallel und mindestens einer Cytosin-Insertion

Tab. 5: Häufigkeit heteroplasmischer Längenpolymorphismen im Muskel- und Gehirngewebe

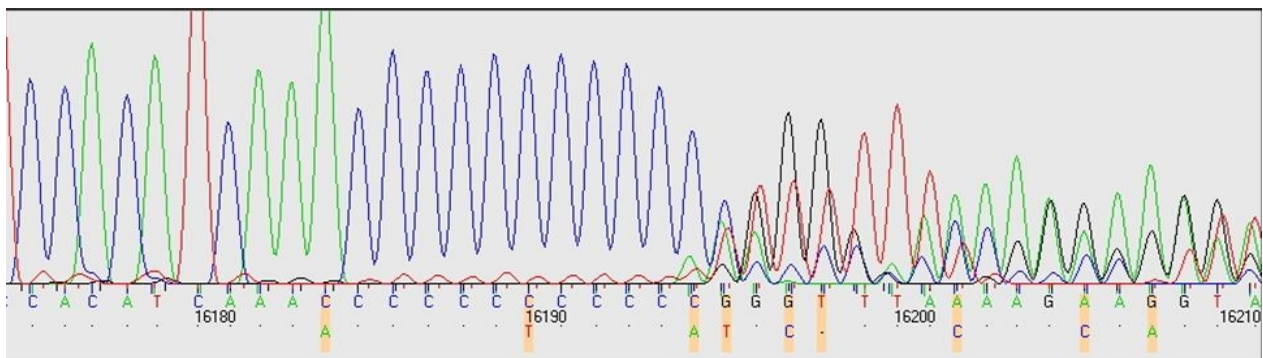


Abb. 13: Sequenzierungsabschnitt mit der Mutation m.16189T>C und einem C-Tract aus einer Kette von 11 aufeinanderfolgenden Cytosin-Basen

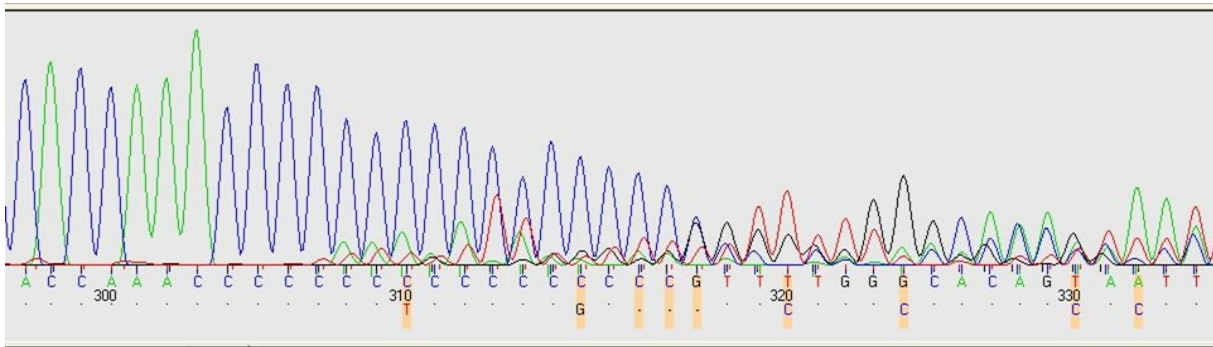


Abb. 14: Sequenzierungsabschnitt mit der Mutation m.310T>C und einem C-Tract aus einer Kette von 16 aufeinanderfolgenden Cytosin-Basen

3.4 Heteroplasmieverteilung in anderen Geweben

Von 12 Patienten lagen außer dem Muskel- bzw. Gehirngewebe zusätzlich Urinsediment oder / und Blutproben vor. Diese wurden nach PCR-Amplifizierung des betreffenden DNA-Fragments direkt sequenziert und mit der Sequenz des postmitotischen Gewebes des entsprechenden Patienten verglichen (siehe Tabelle 6). Es betraf Patienten mit Heteroplasmien an den Positionen 16086, 16093 , 16098, 16124, 16129, 16264, 16291, 16297, 16311, 16428 und 16566. Die Mutation m.16093T>C war in vier, die m.16129G>A in zwei Patienten vertreten. Zwei Patienten besaßen Heteroplasmien an zwei verschiedenen Positionen: ein Patient an Position 16093 und 16129 sowie der andere an Position 16098 und 16254. Der Heteroplasmiegrad der Individuen variierte zwischen den verschiedenen Geweben. In den meisten Fällen war der Heteroplasmiegrad im postmitotischen Gewebe höher als im mitotischen Gewebe. In sieben Proben lag er bei 100 % Mutant, in einer bei 100 % Wildtyp (zumindest in der Sequenzierung war keine Heteroplasmie nachweisbar). Sechs Mutationen waren sowohl im postmitotischen als auch im mitotischen Gewebe heteroplasmisch.

Individuum	Gewebe	Mutation	Mutationsgrad*	Zusatzmaterial	Mutationsgrad*
P1	Gehirn	m.16086T>C	90 + / -0,5 %	Blut	100 %
P2	Muskel	m.16093T>C	46 + / -2 %	Blut	100 %
P3	Gehirn	m.16093T>C	89 + / -6 %	Blut	100 %
P4	Gehirn	m.16093T>C	80 + / -2 %	Blut	93 + / -2 %
P5	Gehirn	m.16093T>C	87 + / -6 %	Blut	100 %
		m.16129G>A	90 + / -5 %	Blut	87 + / -5 %
P6	Muskel	m.16098A>G	9 + / -1 %	Urinsediment	0 %
		m.16264C>T	17 + / -5 %	Urinsediment	7 + / -1 %
P7	Gehirn	m.16124T>C	92 + / -1 %	Blut	100 %
P8	Gehirn	m.16129G>A	79 + / -4 %	Blut	100 %
P9	Muskel	m.16291C>T	72 + / -1 %	Blut	33 + / -6 %
P10	Gehirn	m.16297T>C	43 + / -2 %	Blut	29 + / -5 %
				Urinsediment	35 + / -2 %
P11	Gehirn	m.16311T>C	82 + / -3 %	Blut	80 + / -2 %
P12	Gehirn	m.16566G>A	83 + / -0,5 %	Blut	100 %
				Urinsediment	100 %

* Die Heteroplasmiegrade wurde mit Hilfe von Sequenzierungschromatogrammen bestimmt.

Tab. 6: Mutationen und Heteroplasmiegrad im postmitotischen Gewebe sowie im Urinsediment und / oder Blut

3.5 Einfluss des Alters auf die Heteroplasmiehäufigkeit

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Heteroplasmiehäufigkeit und dem Alter der Individuen besteht, wurden verschiedene Altersgruppen gebildet (siehe Kapitel 2.2.9). Innerhalb dieser Altersgruppen wurde die Heteroplasmiehäufigkeit bestimmt und einer Regressionsanalyse unterzogen. Alle Individuen, deren Alter nicht bekannt war, wurden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Es wurden sowohl Muskel- als auch Gehirnproben verwendet. Die Heteroplasmiehäufigkeit zeigte einen signifikanten Anstieg im Alter ($p = 0,0001$)(siehe Abbildung 15). Dieser Effekt ließ sich ebenso in einer für Gewebe kontrollierten Analyse nachweisen ($p = 0,0001$). Auch bei Kontrolle für Alterskategorien durch Dummy-Variablen (Referenzgruppe jünger als 10 Jahre) findet sich ein linear ansteigender Verlauf der Heteroplasmiehäufigkeit mit

steigendem Alter, der für aller Alterskategorien außer der zweiten (10-19 Jahre) und dritten (20-29 Jahre) statistisch signifikant ist ($p = 0,01$). Eine für das Alter kontrollierte Analyse ergab eine signifikant höhere Heteroplasmiehäufigkeit im Muskel- gegenüber dem Gehirngewebe ($p = 0,05$). Weiterhin wurde das Durchschnittsalter spezifischer Heteroplasmien mit dem der Individuen verglichen, in denen diese Heteroplasmie nicht auftrat. Die Heteroplasmien m.72T>C und m.189A>G im Muskelgewebe wurden signifikant häufiger in Geweben von älteren als von jüngeren Personen angetroffen ($p = 0,0001$) (siehe Abbildung 16 und 17).

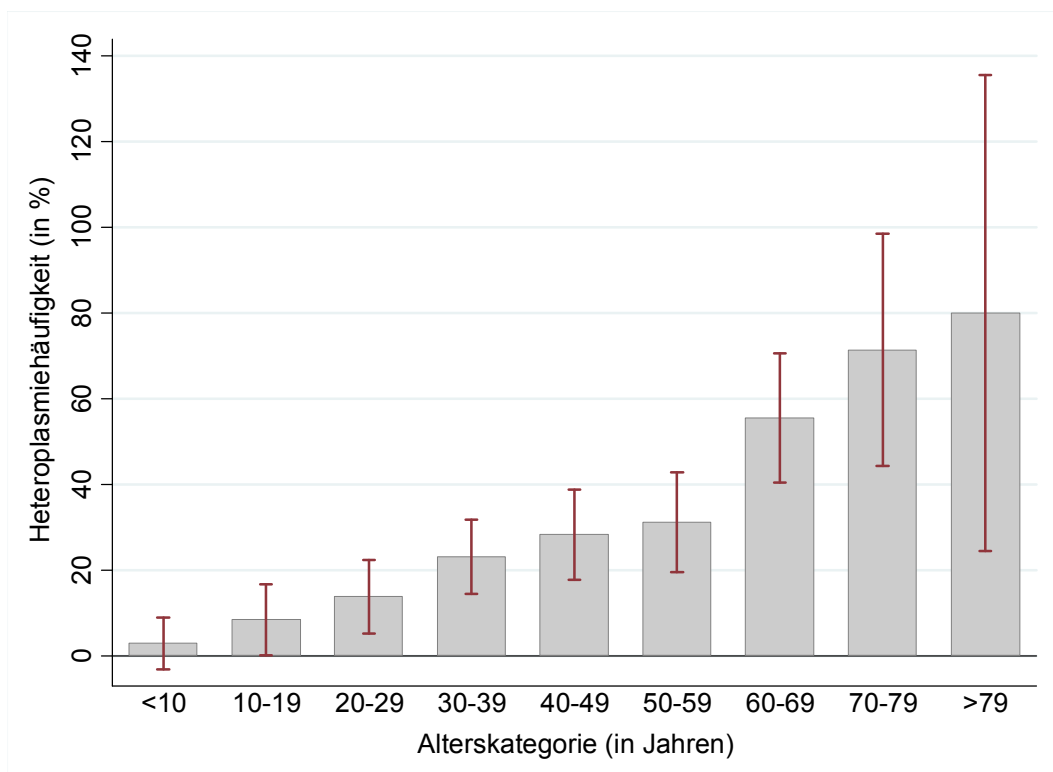


Abb. 15: Heteroplasmiehäufigkeit in verschiedenen Alterskategorien. Die vertikalen Linien repräsentieren die 95 % Konfidenzintervalle.

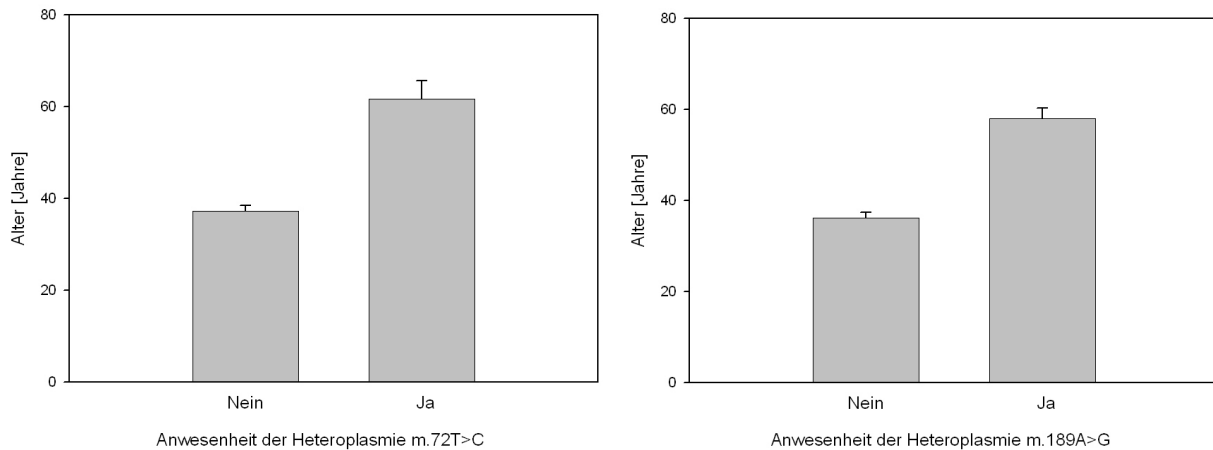


Abbildung 16 (links) und 17 (rechts): Durchschnittsalter der Individuen mit der Heteroplasmie m.72T>C (links), bzw. m.189A>G (rechts) im Vergleich zu dem der Individuen ohne die jeweilige Heteroplasmie. Die vertikalen Linien bilden den Standardfehler ab.

3.6 Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad

Um zu überprüfen, ob ein direkter Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad besteht, wurde eine nach Geweben getrennte Regressionsanalyse durchgeführt, dabei wurden alle Mutationen berücksichtigt. Alle Individuen, deren Alter nicht bekannt war, wurden von der Regressionsanalyse ausgeschlossen. Das Konfidenzintervall mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95 % reichte von -0,002 bis 0,003 für die Muskelproben und von -0,007 bis 0,009 für die Gehirnproben. Die Null war in beiden Intervallen enthalten. Damit gibt es keinen signifikanten Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad, wenn alle Mutationen zusammen betrachtet werden.

3.7 Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad spezifischer Mutationen

Für alle Mutation, die in sechs oder mehr Individuen vertreten waren, wurde eine mutationsspezifische Regressionsanalyse durchgeführt. Es betraf die Mutationen m.16093T>C, m.72T>C, m.183A>G, m.185G>A und m.189A>G im Muskelgewebe, sowie die Mutationen m.16093T>C, m.185G>A und m.189A>G im Gehirngewebe. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Mutationen ergab sich folgendes Bild:

Die Mutation m.16093T>C im Muskel (Individuen diverser Haplogruppen) zeigte eine signifikante Abnahme des Heteroplasmiegrades im Alter ($p = 0,0146$) (siehe Abbildung 18), sowie die Mutation m.72T>C im Muskel (alle Individuen der Haplogruppe H, von einem Individuum war die Haplogruppe nicht eindeutig bestimmbar) ($p = 0,0077$) (siehe Abbildung 19) und die m.189A>G im Gehirn (alle Individuen der Haplogruppe J) ($p = 0,0121$) (siehe Abbildung 20) zeigten eine signifikante Zunahme des Heteroplasmiegrades im Alter.

Die Mutation m.189A>G im Muskel zeigte einen Anstieg im Alter (siehe Abbildung 21), während die m.185G>A im Muskel- und im Gehirngewebe (siehe Abbildung 22 und 23) sowie die m.16093T>C im Gehirngewebe (siehe Abbildung 24) eine Abnahme des Heteroplasmiegrades im Alter zeigten, die jedoch nicht signifikant waren.

Bei der m.183A>G im Muskelgewebe war kein Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad zu beobachten (siehe Abbildung 25).

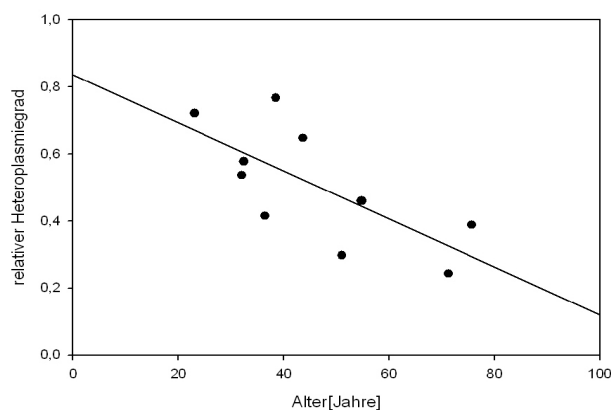


Abbildung 18:

m.16093T>C im Muskelgewebe

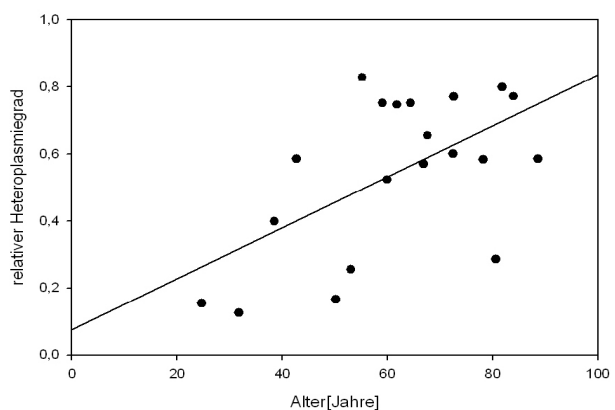
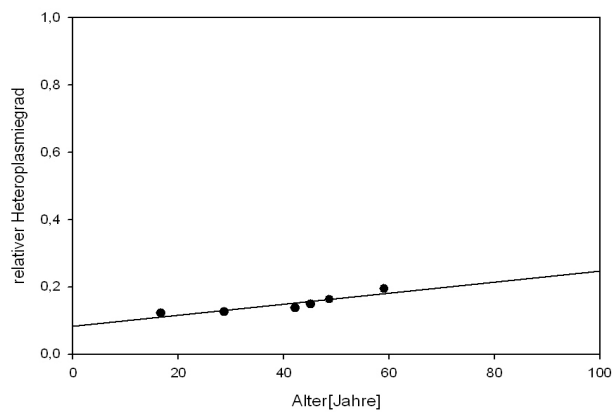
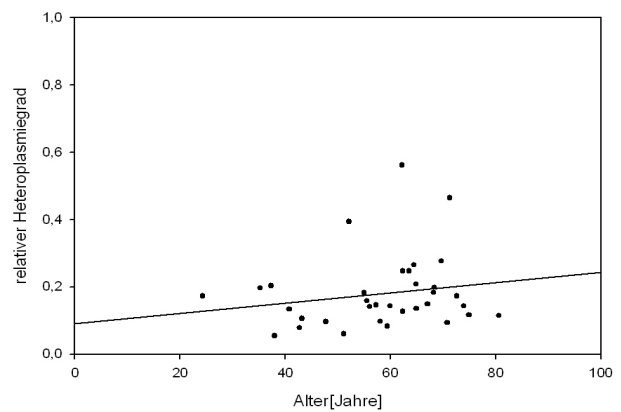


Abbildung 19:

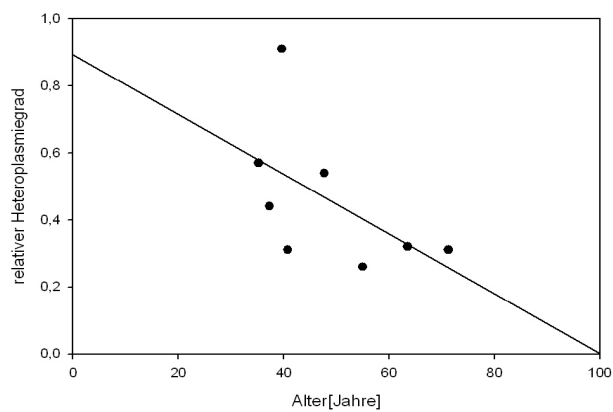
m.72T>C im Muskelgewebe

**Abbildung 20:**

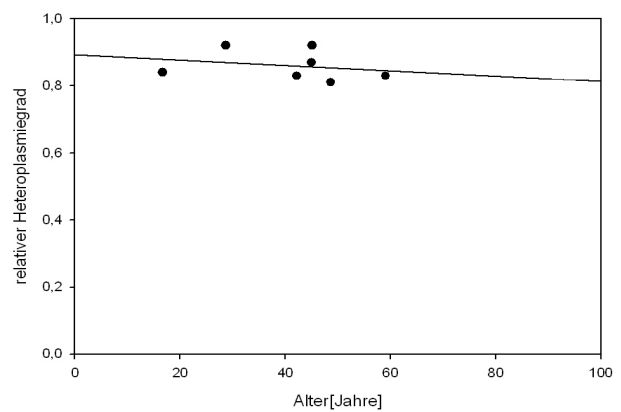
m.189A>G im Gehirngewebe

**Abbildung 21:**

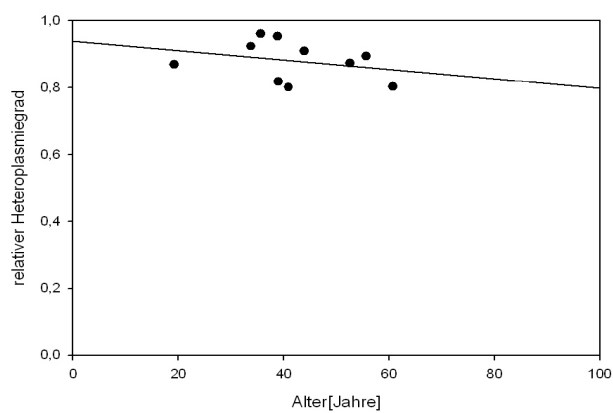
m.189A>G im Muskelgewebe

**Abbildung 22:**

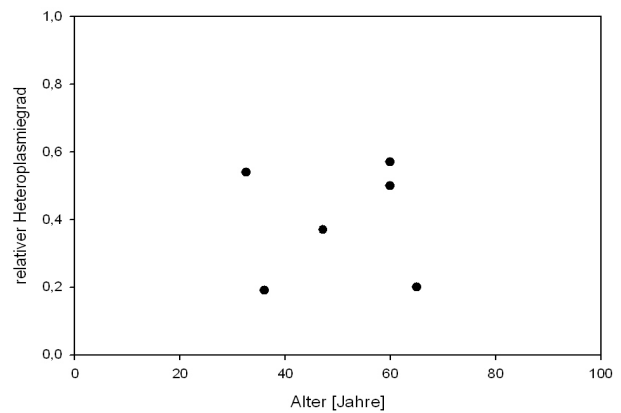
m.185G>A im Muskelgewebe

**Abbildung 23:**

m.185G>A im Gehirngewebe

**Abbildung: 24:**

m.16093T>C im Gehirngewebe

**Abbildung 25:**

m.183A>G im Muskelgewebe

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit und das Spektrum heteroplasmischer Punktmutationen im D-Loop der mtDNA für postmitotisches Gewebe (Muskel und Gehirn) zu bestimmen und diese Mutationen zu charakterisieren.

4.1 Häufigkeit heteroplasmischer Punktmutationen der Kontrollregion humaner mtDNA in postmitotischem Gewebe

Anfangs wurden heteroplasmische Punktmutationen in den meisten Fällen in Individuen mit mitochondrialen Erkrankungen detektiert (Wallace 1992), wie z.B. in Patienten mit MELAS (mitochondrial encephalomyopathie with lactic acidosis and stroke-like episodes) (Goto et al., 1990; Holt et al., 1988; Zeviani et al., 1988) oder MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers) (Shoffner et al., 1990). Nach damaliger wissenschaftlicher Meinung war ihr Vorkommen in der normalen Bevölkerung vernachlässigbar gering (Monnat, Jr. und Loeb, 1985; Monnat, Jr. und Reay, 1986). In den neunziger Jahren häuften sich die Berichte über Heteroplasmien in der normalen Bevölkerung (Bendall et al., 1996; Bendall et al., 1997; Comas et al., 1995; Gill et al., 1994; Jazin et al., 1996; Parsons et al., 1997). Kürzlich durchgeführte Studien schätzten die Häufigkeit heteroplasmischer Punktmutationen in der Kontrollregion humaner mtDNA zwischen 3-14 % abhängig vom untersuchten Gewebe und DNA-Abschnitt (Brandstatter et al., 2004; Calloway et al., 2000; Irwin et al., 2009; Santos et al., 2008; Tully et al., 2000).

Wir fanden heteroplasmische Punktmutationen der Kontrollregion in 31 % der Muskel- und 18 % der Gehirnproben, was deutlich höher ist, als bisher angenommen wurde (Calloway et al., 2000; Sood 2009). Auch die Co-Existenz von zwei oder mehr Heteroplasmien ist mit 5 bis 12 % im postmitotischen Gewebe relativ weit verbreitet. Die Heteroplasmiehäufigkeit war im Muskelgewebe höher als im Gehirn und zeigte einen Anstieg im Alter (siehe Abbildung 15), was im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien steht (Calloway et al., 2000; da Costa et al., 2007; Wang et al., 2001). Eine für das Alter kontrollierte Analyse konnte einen Probenbias infolge eines höheren

Durchschnittsalter der Patienten (40 ± 20 SD), von denen Muskelproben entnommen wurden, gegenüber dem der Patienten (35 ± 15 SD), welchen Gehirnproben entnommen wurden, ausschließen. Calloway und Kollegen fanden in Übereinstimmung damit in Muskelproben mehr heteroplasmische Mutationen als in Gehirnproben der gleichen Individuen (Calloway et al., 2000). Diese Ergebnisse sind möglicherweise dadurch bedingt, dass die Heteroplasmiengrade im Gehirn tendenziell näher am homoplasmischen Zustand als die im Muskel liegen, so dass Heteroplasmie unterhalb des Detektionslimits lag. Die Heterogenität des Gehirngewebes, welches aus einer komplexen Mischung verschiedener Zellpopulationen besteht, darunter sowohl postmitotischen Zellen (Neurone) und mitotischen Zellen (Gliazellen), könnte eine einfache Erklärung für diese Beobachtung darstellen.

Calloway und Kollegen suchten in Muskel, Gehirn, Herzmuskelgewebe und Blut von 43 bzw. 37 Individuen (von 6 Patienten standen keine Muskelproben zur Verfügung) nach Heteroplasmen der HVR II der Kontrollregion. Mit 11 % im Muskel- und 5 % im Gehirngewebe lag die von Calloway und Kollegen detektierte Heteroplasmie-Häufigkeit deutlich unter der unseren. Diese Diskrepanz scheint beträchtlich, vor allem wenn man bedenkt, dass das Durchschnittsalter ihres Probenkollektivs mit 43 Jahren um vier bzw. neun Jahre älter war als das der unseren. Wenn wir nur den von Calloway und Kollegen untersuchten DNA-Abschnitt, welcher von Position 15 bis 429 der Kontrollregion reichte, in die Rechnung mit einbeziehen, sind die Ergebnisse beider Studien besser vergleichbar. Für diese Region beträgt die Häufigkeit heteroplasmischer Punktmutationen 24 % im Muskel- und 7 % im Gehirngewebe. Zumindest im Muskel ist der Abstand noch relativ groß, so dass noch weitere Gründe für diese Diskrepanz bestehen müssen. Wie lassen sich diese Unterschiede erklären? Zunächst einmal gab es methodische Unterschiede in beiden Studien. Calloway und Kollegen benutzten sogenannte immobilisierte sequenzspezifische Oligonukleotide (SSO) zur Detektion von Polymorphismen (Reynolds et al., 2000). Ihr System bestand aus 17 verschiedenen sequenzspezifischen Oligonucleotiden, welche in der Lage waren in bis zu 6 Regionen der HVR II (68-85, 138-161, 184-207, 236-260, 298-314 und 362-394) Heteroplasmen zu erkennen. Folglich konnten Heteroplasmen außerhalb dieser Regionen übersehen werden (Calloway et al., 2000). Zum Beispiel wurde eine Heteroplasmie an Position 64 nur durch direkte Sequenzierung entdeckt.

Außerdem war ihr Probenkollektiv mit 37 bzw. 43 Individuen weitaus kleiner als unserere mit 285 bzw. 179 Individuen. Weiterhin kommen einige Heteroplasmien bevorzugt in bestimmten Haplogruppen vor (Elliott et al., 2008). In unserer Studie traf dieses Phänomen beispielsweise auf die Heteroplasmie m.72T>C, welche besonders häufig in der Haplogruppe H angetroffen wurde (in 19 von 20), auf die m.185G>A, welche vorallem in der Haplogruppe J detektiert wurde (in 13 von 15), sowie die m.16086T>C, deren Heteroplasmieträger alle zur Haplogruppe I gehörten, zu. Irwin und Kollegen fanden unterschiedliche Heteroplasmiehäufigkeiten in verschiedenen Populationsgruppen (Irwin et al., 2009). Die Zusammensetzung des Probenkollektivs kann somit einen Einfluß auf das Mutationsspektrum und letztlich auf die Heteroplasmiehäufigkeit haben. Demnach erklären sich diese Diskrepanzen in der Heteroplasmiehäufigkeit zwischen beiden Studien auf Grund der methodischen Unterschiede und der von einander abweichenden Probenkollektive, wie sie auch in Studien anderer Gewebe vorgekommen sind (Brandstatter et al., 2004; Irwin et al., 2009; Santos et al., 2008; Tully et al., 2000). Mit 18 bzw. 31 % ist die Heteroplasmiehäufigkeit in postmitotischem Gewebe in dieser Arbeit höher als die in Studien, welche mitotisches Gewebe, vor allem Blut und Mundschleimhautepithelien untersuchten haben (Brandstatter et al., 2004; Irwin et al., 2009; Santos et al., 2008; Tully et al., 2000).

4.2 Mutationsspektren von heteroplasmischen Mutationen im D-Loop in postmitotischen und proliferierenden Geweben

Nachdem in den neunziger Jahren das Vorkommen heteroplasmischer mtDNA Mutationen auch in der normalen Bevölkerung zunehmend erkannt wurde, wurden nach der Jahrtausendwende für Gewebe mit proliferierenden Zellen wie Leukozyten und Mundschleimhautepithelien Studien heteroplasmischer Mutationen in der HVR I in größeren Probenkollektiven publiziert (Behar et al., 2007; Brandstatter et al., 2004; Santos et al., 2008; Tully et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind die vorhandenen Veröffentlichungen über heteroplasmische Punktmutationen im D-Loop für postmitotisches Gewebe wie Muskel und insbesondere Gehirn auf Untersuchungen der HVR II und spezifischen Positionen oder kleinen Probenkollektiven limitiert (Calloway et

al., 2000; Jazin et al., 1996; Wang et al., 2001; Wanrooij et al., 2004; Zsurka et al., 2004; Zsurka et al., 2005; Zsurka et al., 2007).

Diese Arbeit gibt einen Überblick der Mutationspektren heteroplasmischer Mutationen im D-Loop in Muskel- und Gehirngewebe (siehe Abbildung 11 und 12). Die Mutationsspektren in der Kontrollregion der humanen mtDNA von Gehirn- und Muskelgewebe ähnelten sich stärker als erwartet (Calloway et al., 2000). Heteroplasmien an Positionen 16086, 16093, 16129, 16297, 152, 185, 189, 195 und 200 wurden in beiden Geweben gefunden, wobei die Heteroplasmie m.189A>G mit 12 % gegenüber 3 % signifikant häufiger im Muskel- als im Gehirngewebe vorkam. Auch die Heteroplasmie m.72T>C wurde mit 7 % gegenüber 0 % signifikant häufiger im Muskel- als im Gehirngewebe detektiert. Weitere Heteroplasmien wie die m.67G>A und die m.183A>G traten bevorzugt im Muskelgewebe auf, auch wenn die Unterschiede auf Grund der niedrigen Anzahl nicht signifikant waren. Das gehäufte Auftreten dieser Mutationen im Muskel zeigt, dass die Verteilung der Heteroplasmien im D-Loop nicht zufällig erfolgt, und legt einen gewebespezifischen Segregationsprozess nahe, der nach gängiger wissenschaftlicher Meinung typisch für somatische Mutationen ist (Michikawa et al., 1999; Nekhaeva et al., 2002). Eine andere muskelspezifische somatische Mutation, die Heteroplasmie m.408T>A, wurde in unserer Studie nur in einer Muskelprobe eines Individuums nachgewiesen, was überrascht, da diese Mutation häufig in Muskelproben älterer Individuen gefunden wurde (da Costa et al., 2007; Del Bo et al., 2002; Wang et al., 2001). In diesen Studien war der Heteroplasmiegrade der m.408T>A insgesamt deutlich niedriger als der der m.189A>G, häufig unter 5 %, was unterhalb unseres Detektionslimits lag, so dass wir sie möglicherweise in einigen Fällen übersehen haben.

Im Gegensatz zum Muskel- gab es im Gehirngewebe keine Heteroplasmie, die eindeutig prominent war. Die meisten Heteroplasmien wurden nur einmal angetroffen oder traten wie die m.16093T>C, m.16129G>A und m.185G>A häufig sowohl in Gehirn- als auch in Muskelgeweben auf, so dass keine Aussage über eine Gewebespezifität gemacht werden konnte.

Viele Heteroplasmien sind nicht auf postmitotisches Gewebe beschränkt, sondern finden sich auch in proliferierendem Gewebe. Unter denen in Abbildung 11 und 12 sowie Tabelle 5 aufgeführten Heteroplasmien wurden die an Position 16093, 16124, 16129,

16172, 16189, 16234, 16295, 16301, 16309, 16311, 16390, 146, 152 und 303-309 zuvor in anderen Studien in Leukozyten beschrieben (Brandstatter et al., 2004; Calloway et al., 2000; Santos et al., 2008; Tully et al., 2000). Weitere Heteroplasmien aus Abbildung 11 und 12 sowie Tabelle 5 an Position 16093, 16124, 16126, 16129, 16162, 16172, 16174, 16182, 16189, 16234, 16261, 16266, 16284, 16291, 16295, 16301, 16309, 16311, 16327, 16344, 16354, 16390, 16482, 73, 152, 214 und 303-309 wurden in Mundschleimhautepithelien gefunden (Behar et al., 2007; Nekhaeva et al., 2002).

Die meisten Heteroplasmien wurden an Positionen gefunden, welche als „mutational hotspots“ (Positionen, die deutlich häufiger mutieren als der Durchschnitt) bezeichnet werden, was im Einklang mit früheren Studien steht (Irwin et al., 2009; Santos et al., 2008; Stoneking 2000; Tully et al., 2000). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Heteroplasmien, welche mit somatischen Mutationen gleichgesetzt wurden, „mutational hotspots“ repräsentieren (Stoneking 2000). Allerdings detektierten wir und andere auch Heteroplasmien an Positionen wie z.B. die 67, 183 oder 16048, welche nicht als „mutational hotspot“ gelten und umgekehrt gibt es eine Reihe von Positionen wie z.B. die 16051, 16223, 16230, 76, 182, 247, 263, welche als „mutational hotspots“ gelten, an denen bisher keine oder wenige Heteroplasmien detektiert wurden (Irwin et al., 2009; Santos et al., 2008; Wulfert et al., 2008). Mit anderen Worten: Die Verteilung der hypervariablen Positionen in der Kontrollregion der mtDNA erklärt nicht alleine das Heteroplasmiespektrum. Es müssen andere oder zumindest zusätzliche Mechanismen als die evolutionäre Mutationsrate bei der Entstehung und Fixation von Mutationen eine Rolle spielen.

In kürzlich veröffentlichten Studien wurde die Selektion als ein möglicher zusätzlicher Mechanismus diskutiert (Irwin et al., 2009; Santos et al., 2008). Demnach seien D-Loop-Mutationen nicht strikt neutral, sondern könnten einen Selektionsvorteil oder -nachteil mit sich bringen. Beispielsweise hätte eine geringgradig schädliche Mutation eine niedrigere Wahrscheinlichkeit, in einer Abstammungslinie fixiert zu werden. Als Ergänzung sei hier angemerkt, dass heteroplasmische Mutation nicht zwangsläufig somatischen Mutationen entsprechen (Brandstatter et al., 2004; He et al., 2010; Sekiguchi et al., 2003; Zsurka et al., 2007). Die Vererbung heteroplasmischer Mutationen über mehrere Generationen würde ebenfalls zu einer Diskrepanz von Heteroplasmiehäufigkeit und positionsspezifischer Mutationsrate führen. Diese

Mutationen würden häufiger auftreten als es nach ihrer positionsspezifischen Mutationsrate zu erwarten wäre.

4.3 Sind heteroplasmische Mutationen somatisch oder vererbt?

Heteroplasmien können ihren Ursprung in den Keimzellen haben oder durch ein somatisches Ereignis entstehen, sie sind folglich vererbt oder somatisch.

Da zahlreiche Heteroplasmien in mehr als einem Gewebe auftreten (siehe voriges Kapitel), kommen sie als potentielle Kandidaten für vererbte Mutationen in Frage. Und es gibt weitere Hinweise, die dafür sprechen, dass zumindest einige Heteroplasmien eher vererbt als somatisch sind:

Zunächst fanden wir, wie andere Studien auch, Heteroplasmie nicht nur in älteren sondern auch in jungen Individuen mit zum Teil hohen Heteroplasmiegraden. Individuen mit Heteroplasmien an Positionen m.16086T>C, m.16093T>C, m.16172T>C, m.16297T>C, m.16354T>C, m.185G>A, m.189A>G, m.195T>C, m.200A>G und m.500C>G waren unter 20 Jahre alt. Wenn die Berechnungen von Khrapko und Kollegen stimmen, müssen Jahrzehnte vergehen, bis somatische Mutationen in einzelnen Zellen detektierbare Heteroplasmiegrade erreichen (Khrapko et al., 2003). Dies gilt insbesondere für Gewebe mit hoher Kopienzahl pro Zelle wie Muskel und Gehirn, welche zwischen 4000 und 24000 Kopien der mtDNA beherbergen (Lightowlers et al., 1997; Zsurka et al., 2008). Je jünger das Individuum und je höher der Heteroplasmiegrad, desto schneller müsste die Expansion verlaufen. Folglich sind Heteroplasmien, welche in jungen Individuen gefunden wurden, wahrscheinlich vererbt, sofern nicht ein Prozess zu Grunde gelegt wird, der die Expansion somatischer Mutationen beschleunigt. Eine Abnahme der Segregations-Einheiten beispielsweise könnte zu einer Beschleunigung der Segregation führen (Coller et al., 2001; Coller et al., 2002; Preiss et al., 1995; Zsurka et al., 2008).

In sechs von 12 Individuen, von denen zusätzliches Probenmaterial zur Verfügung stand, war die Heteroplasmie in zwei oder mehr Geweben detektierbar. Das betraf die Heteroplasmie m.16093T>C in Individuum P4, die m.16129G>A in P5, die m.16264C>T in P6, die m.16291C>T in P9, die m.16297T>C in P10 und die m.16311t>C in P11 (siehe Tabelle 6). Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Verteilung ist eine

Vererbung der Heteroplasmie durch die Mütter, besonders für Individuum P10, in welchem die Heteroplasmie in allen vorliegenden Geweben mit ähnlichen Heteroplasmiegraden detektiert wurde. Da keine maternalen Proben zur Verfügung standen, welche dies belegen könnten, kommt auch eine klonale Expansion einer in einem frühen Stadium der Embryogenese entstandenen Mutation, welche sich auf mehrere Gewebe verteilt hat, in Betracht.

Die Abwesenheit der Heteroplasmien m.16086T>C in Individuum P1, m.16093T>C in P2, P3 und P5 sowie die m.16124T>C in P7, die m.16129G>A in P8 und die m.16566G>A in P12 im Blut und / oder Urinsediment suggeriert eine somatische Entstehung dieser Mutationen, auch wenn nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass die Heteroplasmiegrade in diesen Geweben unterhalb des Detektionslimits lagen und sich dem Nachweis entzogen haben, was häufig der Fall ist (Ballana et al., 2008; Calloway et al., 2000; Nakahara et al., 2008; Wang und Boles, 2006; Zsurka et al., 2004). Alternativ könnte es sich um vererbte Heteroplasmien handeln, welche in den Leukozyten und / oder Epithelzellen durch somatische Segregation einen homoplasmischen Zustand erreicht haben, ein Phänomen, welches in Kopf-Hals-Tumoren von Patienten mit heteroplasmischen Punktmutationen sowie für andere somatische Zellen, wie z.B. Darmepithelzellen und Haarfollikel, sowie in Zellkulturen beobachtet wurde (Gekeler et al., 2009; Levin et al., 1999; Lutz-Bonengel et al., 2008a). Die hohe Teilungsrate in Leukozyten, welche zwischen 200 und 500 mtDNA Moleküle tragen, könnte einen Segregationsprozess beschleunigen (Coller et al., 2002; Preiss et al., 1995; Zsurka et al., 2008). Diese Erklärung kommt beispielsweise bei der Heteroplasmie m.16086T>C in Individuum P1, das zum Zeitpunkt der Gehirnbiopsie erst 17 Jahre alt war, in Frage.

Schließlich detektierten wir in maternalen Verwandten zweier Individuen die gleichen heteroplasmischen Mutationen in verschiedenen Geweben, in der einen Familie die m.16182A>C und in der anderen die m.16428G>A (Zsurka et al., 2007). In der einen Familie trug eine Tante mütterlicherseits die Heteroplasmie m.16428A>G im Blut und im Urinsediment. Im anderen Fall wurde die Heteroplasmie m.16182A>C im Blut der Schwester sowie einer Tante mütterlichseits des Individuums nachgewiesen. Die Präsenz heteroplasmischer D-Loop-Mutationen in maternalen Verwandten wurde zuvor in anderen Studien über bis zu drei Generationen beschrieben, darunter auch

Mutationen, die wir in unserer Studien detektiert haben, wie die m.16291C>T (Brandstatter et al., 2004; Carelli et al., 2006; Parsons et al., 1997; Sekiguchi et al., 2003). Da die Familienmitglieder die Heteroplasmien an den gleichen Positionen trugen, sind diese wahrscheinlich vererbt. Andernfalls müsste von einer familien- und positionsspezifischen Instabilität der mtDNA ausgegangen werden. Zumindest in diesen beiden Familien scheint diese Möglichkeit unwahrscheinlich, da es sich bei beiden Mutationen um seltene Polymorphismen handelt (Benson et al., 2008; Ingman und Gyllensten, 2006; Zsurka et al., 2007). Diese D-Loop-Heteroplasmien verhalten sich ähnlich wie pathogene Mutationen, wie beispielsweise die m.3243A>G (MELAS) oder die m.8344A>G (MERRF), bei denen eine Vererbung über mehrere Generationen allgemein anerkannt ist (Elson et al., 2009; Poulton und Turnbull, 2000).

Einige Heteroplasmien traten bevorzugt im Muskelgewebe auf. Die m.72T>C wurde in 7 % der Muskelproben gefunden, im Gehirn dagegen war sie abwesend, was im Einklang mit den Ergebnissen von Calloway et al. (2000) steht. Diese Mutation trat signifikant häufiger in älteren als in jungen Individuen auf und ihr Heteroplasmiegrad stieg im Alter an (siehe Abbildungen 16 und 19). Folglich handelt es sich wahrscheinlich um eine somatische Mutation. Eine Studie von Zsurka und Kollegen konnte die m.72T>C in einem jungen Patienten mit einem POLG-Defekt außer im Muskel auch noch in der Leber und in Spuren im Gehirn im heteroplasmischen Zustand nachweisen (Zsurka et al., 2008). Der Vergleich zweier Muskelproben dieses Patienten zeigte einen Anstieg des Heteroplasmiegrades im Alter, was im Einklang mit unseren Ergebnissen steht. In diesem Fall handelt es sich wahrscheinlich um eine somatische Mutation, welche in einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese entstand und sich auf mehrere Gewebe verteilte, auch wenn eine Vererbung der Mutation nicht ausgeschlossen werden kann, da keine Proben von maternalen Verwandten vorlagen (entsprechende Proben waren nicht verfügbar).

Die häufigste heteroplasmische Punktmutation in unserem Probenkollektiv war die m.189A>G, welche in 12 % der Muskel- und 3 % der Gehirnproben vorkam. Die m.189A>G wurden zuvor in Gehirn- und Muskelgewebe beschrieben (Calloway et al., 2000; Jazin et al., 1996) und galt auf Grund ihrer Gewebespezifität und der Altersakkumulation als somatische Mutation (Wang et al., 2001). Allerdings gibt es Hinweise, dass die Heteroplasmie m.189A>G in einigen Fällen auch vererbt sein könnte

(Khrapko et al., 2003). Khrapko und Kollegen konnten die m.189A>G in der Mutter eines heteroplasmischen Allelträgers nachweisen. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass wir die Heteroplasmie m.189A>G auch im Gehirngewebe junger Individuen fanden (siehe Abbildung 20). Interessanterweise gehörten alle diese Individuen der Haplogruppe J an, in der die m.A>189G als Polymorphismus vorkommt (Finnila et al., 2001). Wenn es sich in diesem Fall um eine somatische Mutation handeln sollte, müsste eine kontextabhängige Instabilität der m.189A>G in der Haplogruppe J postuliert werden, was unwahrscheinlich scheint, da die m.189A>G zusammen mit der m.185G>A im Doppelmutantentest triplasmisch war (Khrapko et al., 2003; Zsurka et al., 2005).

4.4 Wie kommt es zu einer Akkumulation heteroplasmischer Mutationen im Gewebe?

Wie kommt es zu der Akkumulation heteroplasmischer Mutationen im Gewebe? Entstehen sie durch fortlaufende multiple Mutationen oder durch klonale Expansion eines frühen Mutationseignisses? Folgende Beobachtungen sprechen gegen eine fortlaufende Mutationsgenese durch eine erhöhte Mutationsrate. Alle Mutationen betrachtet konnte weder für Muskel- noch für Gehirngewebe ein Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war für einige spezifische Mutationen ein Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad festzustellen, auch wenn der Heteroplasmiegrad zum Teil eine hohe Variabilität aufwies (siehe Abbildungen 18, 19 und 20). Eine hohe Variabilität von Heteroplasmiegraden unterschiedlicher Mutationen wurde bereits in Fibroblasten, Skelettmuskeln, Gehirn und Leukozyten beobachtet. (da Costa et al., 2007; Jazin et al., 1996; Michikawa et al., 1999; Wang et al., 2001; Zhang et al., 2003). In einer Studie von Nekhaeva und Kollegen wurde demonstriert, dass die Mutationsfraktion auch innerhalb des gleichen Gewebes eines Individuums von Zelle zu Zelle deutlichen Schwankungen unterliegt (Nekhaeva et al., 2002). Um diese Verteilungen mit Hilfe von sich wiederholenden Mutationen zu erklären, müssten beträchtliche Schwankungen der Mutationsrate von Individuum zu Individuum, von Gewebe zu Gewebe und von Zelle zu Zelle postuliert werden (Khrapko et al., 2004). Dies scheint unwahrscheinlich, da zahlreiche Mechanismen der Mutagenese existieren müssten (Khrapko et al., 2003).

Wenn neue Mutationen durch multiple Mutationseignisse entstehen, würden sich

innerhalb einer Zelle mehrere verschiedene Mutationen verteilen, solange die Mutationsgenese zufällig ist. Jede Zelle, jedes Gewebe und jedes Individuum würde zahlreiche unterschiedliche Mutationen in geringen Kopiezahlen tragen, so dass zahlreiche Mutationen mit niedrigen Heteroplasmiegraden innerhalb einer Zelle, eines Gewebes und eines Individuums gefunden würden oder aber sie könnten durch direktes Sequenzieren nicht detektiert werden, sofern sie unterhalb des Detektionslimits lägen. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit Befunden der Literatur in den meisten Geweben eine oder wenige Heteroplasmien mit zum Teil hohen Heteroplasmiegraden gefunden (Calloway et al., 2000; He et al., 2010; Michikawa et al., 1999; Wang et al., 2001; Zhang et al., 2003). Ähnliche Mutationsmuster wurden für Punktmutationen und Deletionen in Einzel-Zell-Studien beobachtet (Durham et al., 2006; Khrapko et al., 1999; Lutz-Bonengel et al., 2008a; Nekhaeva et al., 2002). In den meisten Fällen wurde eine oder selten zwei Mutationen pro Zelle entdeckt und unterschiedliche Zellen trugen unterschiedliche Mutationen. Dies und die Tatsache, dass einige Heteroplasmien in mehr als einem Gewebe gefunden wurden, unterstützen die Theorie der klonalen Expansion eines oder zumindest weniger Mutationsereignisse (He et al., 2010; Lutz-Bonengel et al., 2008b; Zsurka et al., 2004; Zsurka et al., 2008).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit und das Spektrum heteroplasmischer Mutationen im postmitotischen Gewebe, welche für evolutionsbiologische und forensische Studien von Bedeutung sind, zu bestimmen. In dieser Studie wurden insgesamt 464 Proben von Patienten, darunter 285 Muskel- und 179 Gehirnbiospien, mittels DHPLC und Sequenzierung auf heteroplasmische Mutationen in der Kontrollregion der mtDNA untersucht. Von einigen Patienten waren weitere Proben aus Blut und / oder Urin verfügbar, welche ebenfalls analysiert wurden.

Die Heteroplasmiehäufigkeit lag bei 31 % im Muskel- und 18 % im Gehirngewebe, was deutlich höher ist als in vorherigen Studien. Dieses Ergebniss ist am ehesten mit dem sensitiveren Screeningverfahren gegenüber früheren Arbeiten und mit populationsbedingten Unterschieden zu erklären. Die Unterschiede zwischen Muskel- und Gehirngewebe können gewebs- (das Gehirngewebe besteht aus einer komplexen Mischung verschiedener Zellpopulationen), altersbedingt und / oder auch dadurch bedingt sein, dass die Heteroplasmie häufiger unterhalb des Detektionslimits lag. In postmitotischem Gewebe trat Heteroplasmie häufiger auf als in vergleichbaren Studien an proliferierendem Gewebe.

Einige Heteroplasmien wie die m.72T>C und m.189A>G wurden bevorzugt im Muskelgewebe nachgewiesen, in älteren häufiger als in jüngeren Individuen. Bei diesen beiden Mutationen handelt es sich wahrscheinlich um somatische Mutationen. Andere Heteroplasmien wie die m. 16264C>T, m.16291C>T, m.16297T>C und m.16311T>C wurde in mehreren verschiedenen Geweben detektiert. In zwei Fällen wie bei der Mutation m.16428A>G und der m.16182A>C, in denen ebenfalls Proben von Familienangehörigen vorlagen, konnten die Heteroplasmien ebenfalls in maternalen Verwandten nachgewiesen werden. Diese sind deshalb als vererbte Mutationen zu klassifizieren.

Die meisten Proben zeigten Heteroplasmie nur an einer Position. Lediglich 9 % der Proben trugen Heteroplasmie an zwei oder drei Positionen. Einige Heteroplasmien wurde in mehreren verschiedenen Geweben detektiert. Diese Verteilung spricht gegen einen fortlaufenden Prozess der Mutationsentstehung durch eine erhöhte Mutationsrate. Sie stützt die Hypothese von seltenen Mutationsereignissen, gefolgt von einer klonalen

Expansion. Die klonale Expansion einzelner Mutationen würde erklären, warum für einige spezifische Mutationen ein Einfluss des Alters auf den Heteroplasmiegrad nachzuweisen ist, während dieses Phänomen nicht beobachtet wird, wenn alle Mutationen zusammen betrachtet werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnummer und Titel	Seite
Abb. 1 Schematische Darstellung der mtDNA und ihrer Gene	8
Abb. 2 Schematische Darstellung der Replikationsmodelle mtDNA	10
Abb. 3 Schematische Darstellung des genetischen Flaschenhalses	12
Abb. 4 Schematische Darstellung des circulus vitiosus der Alterungstheorie	16
Abb. 5 Schematische Darstellung der mitochondriale DNA und der verwendeten Primer	28
Abb. 6 Schematische Darstellung der DNA-Duplices und des Elutionsprofiles von Homo und Heteroduplices	33
Abb. 7 Beispiel für die Berechnung des Heteroplasmiegrades	35
Abb. 8 Schematische Übersicht der einzelnen Projektteile dieser Arbeit	38
Abb. 9 Ergebnisse des Kontrollexperiments	40-41
Abb. 10 DHPLC-Profil eines C-Tract Polymorphismus	42
Abb. 11 Allelfrequenz im Muskelgewebe	44
Abb. 12 Allelfrequenz im Gehirngewebe	45
Abb. 13 Sequenzierungsabschnitt der Mutation m.16189T>C und nachfolgendem C-tract	46
Abb. 14 Sequenzierungsabschnitt mit der Mutation m.310T>C und nachfolgendem C-tract	47
Abb. 15 Heteroplasmiehäufigkeit in verschiedenen Alterskategorien	49
Abb. 16 Durchschnittsalter der Individuen mit der Heteroplasmie m.72T>C	50
Abb. 17 Durchschnittsalter der Individuen mit der Heteroplasmie m.189A>G	50
Abb. 18 m.16093T>C Heteroplasmiegrad gegen Alter im Muskelgewebe	51
Abb. 19 m.72T>C Heteroplasmiegrad gegen Alter im Muskelgewebe	51
Abb. 20 m.189A>G Heteroplasmiegrad gegen Alter im Gehirngewebe	52
Abb. 21 m.189A>G Heteroplasmiegrad gegen Alter im Muskelgewebe	52
Abb. 22 m.185G>A Heteroplasmiegrad gegen Alter im Muskelgewebe	52
Abb. 23 m.185G>A Heteroplasmiegrad gegen Alter im Gehirngewebe	52

Abb. 24	m.16093T>C Heteroplasmiegrad gegen Alter im Gehirngewebe	52
Abb. 25	m.183A>G Heteroplasmiegrad gegen Alter im Muskelgewebe	52

7 Tabellenverzeichnis

Tabellennummer und Titel	Seite
Tab. 1 Übersicht der Einzelkomponenten der PCR-Amplifikation des DNA-Abschnittes D-Loop1 und die verwendeten Reaktionsbedingungen	28-29
Tab. 2 Übersicht der Einzelkomponenten der PCR-Amplifikation des DNA-Abschnittes D-Loop2 und die verwendeten Reaktionsbedingungen	29
Tab. 3 Zusammensetzung des Polyacrilamidgels Gels	31
Tab. 4 Ergebnisse der DHPLC-Analyse	42
Tab. 5 Häufigkeit heteroplasmischer Längenpolymorphismen im Muskel- und Gehirngewebe	46
Tab. 6 Mutationen und Heteroplasmiegrad im postmitotischem Gewebe sowie in Urinsediment und / oder Blut	48

8 Literaturverzeichnis

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; 23: 147

Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4: 289-333

Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith JM. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 1999; 286: 2524-2525

Ballana E, Govea N, de CR, Garcia C, Arribas C, Rosell J, Estivill X. Detection of unrecognized low-level mtDNA heteroplasmy may explain the variable phenotypic expressivity of apparently homoplasmic mtDNA mutations. *Hum Mutat* 2008; 29: 248-257

Bandelt HJ, Macaulay V, Richards M. *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*. Berlin: Springer Verlag, 2006

Barron MJ, Chinnery PF, Howel D, Blakely EL, Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM. Cytochrome c oxidase deficient muscle fibres: substantial variation in their proportions within skeletal muscles from patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 768-774

Behar DM, Rosset S, Blue-Smith J, Balanovsky O, Tzur S, Comas D, Mitchell RJ, Quintana-Murci L, Tyler-Smith C, Wells RS. The Genographic Project public participation mitochondrial DNA database. *PLoS Genet* 2007; 3: e104

Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1276-1287

Bendall KE, Macaulay VA, Sykes BC. Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1303-1308

Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 2006; 38: 515-517

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. *GenBank. Nucleic*

Acids Res 2008; 36: D25-D30

Bergstrom CT, Pritchard J. Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. *Genetics* 1998; 149: 2135-2146

Birky CW, Jr. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 125-148

Bodyak ND, Nekhaeva E, Wei JY, Khrapko K. Quantification and sequencing of somatic deleted mtDNA in single cells: evidence for partially duplicated mtDNA in aged human tissues. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 17-24

Bogenhagen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 1977; 11: 719-727

Bonner R . Enhancing Core Facility Services with the Wave Nucleic Acid Fragment Analysis System Technology. Transgenomic Inc 2000; Application Note 109:

Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 2003; 278: 50961-50969

Brandstatter A, Niederstatter H, Parson W. Monitoring the inheritance of heteroplasmy by computer-assisted detection of mixed basecalls in the entire human mitochondrial DNA control region. *Int J Legal Med* 2004; 118: 47-54

Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C, Clayton DA. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev* 2005; 19: 2466-2476

Calloway CD, Reynolds RL, Herrin GL, Jr., Anderson WW. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1384-1397

Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, Hara T, Hayashi J, Yonekawa H. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 2007; 39: 386-390

Carelli V, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O, Pala M, Olivieri A, Mattiazzi M, Pallotti F, Carrara F, Zeviani M, Leuzzi V, Carducci C, Valle G, Simionati B, Mendieta L, Salomao S, Belfort R, Jr., Sadun AA, Torroni A. Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 564-574

Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Taylor RW, Bindoff LA, Turnbull DM. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 2000a; 48: 188-193

Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 2000b; 16: 500-505

Chinnery PF, Zwiijnenburg PJ, Walker M, Howell N, Taylor RW, Lightowlers RN, Bindoff L, Turnbull DM. Nonrandom tissue distribution of mutant mtDNA. *Am J Med Genet* 1999; 85: 498-501

Clayton DA . Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 1982; 28: 693-705

Clayton DA . Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 453-478

Clayton DA . Mitochondrial DNA gets the drift. *Nat Genet* 1996; 14: 123-125

Clayton DA . Nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biofactors* 1998; 7: 203-205

Coller HA, Bodyak ND, Khrapko K. Frequent intracellular clonal expansions of somatic mtDNA mutations: significance and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 434-447

Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* 2001; 28: 147-150

Comas D, Paabo S, Bertranpetit J. Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *Genome Res* 1995; 5: 89-90

Cree LM, Samuels DC, Chinnery PF. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim Biophys Acta* 2009;

Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, Dahl HH, Chinnery PF. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 2008; 40: 249-254

Cummins JM, Wakayama T, Yanagimachi R. Fate of microinjected sperm components in the mouse oocyte and embryo. *Zygote* 1997; 5: 301-308

D'Aurelio M, Gajewski CD, Lin MT, Mauck WM, Shao LZ, Lenaz G, Moraes CT,

Manfredi G. Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 3171-3179

da Costa CK, Kiyomoto BH, Schmidt B, Oliveira AS, Gabbai AA, Tengan CH. Age-related mitochondrial DNA point mutations in patients with mitochondrial myopathy. *J Neurol Sci* 2007; 263: 139-144

Del Bo R, Bordini A, Martinelli BF, Crimi M, Sciacco M, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. Evidence and age-related distribution of mtDNA D-loop point mutations in skeletal muscle from healthy subjects and mitochondrial patients. *J Neurol Sci* 2002; 202: 85-91

DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; 37: 222-232

Durham SE, Samuels DC, Chinnery PF. Is selection required for the accumulation of somatic mitochondrial DNA mutations in post-mitotic cells? *Neuromuscul Disord* 2006; 16: 381-386

Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 254-260

Elson JL, Andrews RM, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 145-153

Elson JL, Lightowlers RN. Mitochondrial DNA clonality in the dock: can surveillance swing the case? *Trends Genet* 2006; 22: 603-607

Elson JL, Swalwell H, Blakely EL, McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. Pathogenic mitochondrial tRNA mutations--which mutations are inherited and why? *Hum Mutat* 2009; 30: E984-E992

Eyre-Walker A, Smith NH, Smith JM. How clonal are human mitochondria? *Proc Biol Sci* 1999; 266: 477-483

Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 2002; 31: 289-294

Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 679-699

Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 2003; 88: 41-56

Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C, Vila MR, Shanske S, Hirano M, Andreu AL, DiMauro S. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies

1. *Ann Neurol* 2003; 54: 524-526

Finnila S, Lehtonen MS, Majamaa K. Phylogenetic network for European mtDNA. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1475-1484

Fish J, Raule N, Attardi G. Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Science* 2004; 306: 2098-2101

Garstka HL, Schmitt WE, Schultz J, Sogl B, Silakowski B, Perez-Martos A, Montoya J, Wiesner RJ. Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5039-5047

Gekeler J, Zsurka G, Kunz WS, Preuss SF, Klussmann JP, Guntinas-Lichius O, Wiesner RJ. Clonal expansion of different mtDNA variants without selective advantage in solid tumors. *Mutat Res* 2009; 662: 28-32

Gensler S, Weber K, Schmitt WE, Perez-Martos A, Enriquez JA, Montoya J, Wiesner RJ. Mechanism of mammalian mitochondrial DNA replication: import of mitochondrial transcription factor A into isolated mitochondria stimulates 7S DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 3657-3663

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 6715-6719

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 1994; 6: 130-135

Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348: 651-653

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 1991; 352: 255-257

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300

Hasegawa M, Di RA, Kocher TD, Wilson AC. Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree. *J Mol Evol* 1993; 37: 347-354

He Y, Wu J, Dressman DC, Iacobuzio-Donahue C, Markowitz SD, Velculescu VE, et al. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 2010;

Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, Labuda D. Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of control region mutations in deep-rooting pedigrees. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1113-1126

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-719

Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 2000; 100: 515-524

Howell N, Smejkal CB, Mackey DA, Chinnery PF, Turnbull DM, Herrnstadt C. The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: there is a difference between phylogenetic and pedigree rates. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 659-670

Ingman M, Gyllensten U. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D749-D751

Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000; 408: 708-713

Innan H, Nordborg M. Recombination or mutational hot spots in human mtDNA? *Mol Biol Evol* 2002; 19: 1122-1127

Irwin JA, Saunier JL, Niederstatter H, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, Brandstatter A, Parson W, Parsons TJ. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol* 2009; 68: 516-527

Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet* 1996; 12: 417-420

Jacobs HT. The mitochondrial theory of aging: dead or alive? *Aging Cell* 2003; 2: 11-17

Jazin EE, Cavelier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12382-12387

Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1996; 14: 146-151

Kajander OA, Rovio AT, Majamaa K, Poulton J, Spelbrink JN, Holt IJ, Karhunen PJ, Jacobs HT. Human mtDNA sublimons resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2821-2835

Khrapko K . Two ways to make an mtDNA bottleneck. *Nat Genet* 2008; 40: 134-135

Khrapko K, Bodyak N, Thilly WG, Van Orsouw NJ, Zhang X, Collier HA, Perls TT, Upton M, Vijg J, Wei JY. Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2434-2441

Khrapko K, Collier HA, Andre PC, Li XC, Hanekamp JS, Thilly WG. Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13798-13803

Khrapko K, Ebratidse K, Kraytsberg Y. Where and when do somatic mtDNA mutations occur? *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 240-244

Khrapko K, Nekhaeva E, Kraytsberg Y, Kunz W. Clonal expansions of mitochondrial genomes: implications for in vivo mutational spectra. *Mutat Res* 2003; 522: 13-19

King MP, Attardi G. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell* 1988; 52: 811-819

Kirches E, Michael M, Warich-Kirches M, Schneider T, Weis S, Krause G, Mawrin C, Dietzmann K. Heterogeneous tissue distribution of a mitochondrial DNA polymorphism in heteroplasmic subjects without mitochondrial disorders. *J Med Genet* 2001; 38: 312-317

Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, Seeberg E, Lindahl T, Barnes DE. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13300-13305

Koehler CM, Lindberg GL, Brown DR, Beitz DC, Freeman AE, Mayfield JE, Myers AM. Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics* 1991; 129: 247-255

Korhonen JA, Pham XH, Pellegrini M, Falkenberg M. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J* 2004; 23: 2423-2429

Krakauer DC, Mira A. Mitochondria and germ-cell death. *Nature* 1999; 400: 125-126

Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 2006; 38: 518-520

Kraytsberg Y, Schwartz M, Brown TA, Ebraldise K, Kunz WS, Clayton DA, Vissing J, Khrapko K. Recombination of human mitochondrial DNA. *Science* 2004; 304: 981

Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 2004; 279: 4127-4135

Levin BC, Cheng H, Reeder DJ. A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. *Genomics* 1999; 55: 135-146

Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet* 1997; 13: 450-455

Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 29-33

Lutz-Bonengel S, Sanger T, Parson W, Muller H, Ellwart JW, Follo M, Bonengel B, Niederstatter H, Heinrich M, Schmidt U. Single lymphocytes from two healthy individuals with mitochondrial point heteroplasmy are mainly homoplasmic. *Int J Legal Med* 2008a; 122: 189-197

Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Sanger T, Heinrich M, Schneider PM, Pollak S. Analysis of mitochondrial length heteroplasmy in monozygous and non-monozygous siblings. *Int J Legal Med* 2008b; 122: 315-321

Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 953-960

Margineantu DH, Gregory CW, Sundell L, Sherwood SW, Beechem JM, Capaldi RA. Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 2002; 1: 425-435

McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 113-155

Meyer S, Weiss G, von HA. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics* 1999; 152: 1103-1110

Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999; 286: 774-779

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215

Monnat RJ, Jr., Loeb LA. Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 2895-2899

Monnat RJ, Jr., Reay DT. Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues. *Gene* 1986; 43: 205-211

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-273

Murdock DG, Christacos NC, Wallace DC. The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 4350-4355

Nakahara H, Sekiguchi K, Imaizumi K, Mizuno N, Kasai K. Heteroplasmies detected in an amplified mitochondrial DNA control region from a small amount of template. *J Forensic Sci* 2008; 53: 306-311

Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 2004; 55: 706-712

Nekhaeva E, Bodyak ND, Kraytsberg Y, McGrath SB, Van Orsouw NJ, Pluzhnikov A, Wei JY, Vijg J, Khrapko K. Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5521-5526

Oefner PJ, Huber CG. A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 782: 27-55

Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 1995; 57: 266

Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 1981; 290: 470-474

Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev*

Genomics Hum Genet 2005; 6: 165-183

Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, liston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland MM. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. Nat Genet 1997; 15: 363-368

Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. Hum Mol Genet 2002; 11: 1581-1583

Poulton J, Macaulay V, Marchington DR. Mitochondrial genetics '98 is the bottleneck cracked? Am J Hum Genet 1998; 62: 752-757

Poulton J, Turnbull DM. 74th ENMC international workshop: mitochondrial diseases 19-20 november 1999, Naarden, the netherlands
2. Neuromuscul Disord 2000; 10: 460-462

Preiss T, Lowerson SA, Weber K, Lightowlers RN. Human mitochondria: distinct organelles or dynamic network? Trends Genet 1995; 11: 211-212

Reynolds R, Walker K, Varlaro J, Allen M, Clark E, Alavaren M, Erlich H. Detection of sequence variation in the HVII region of the human mitochondrial genome in 689 individuals using immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. J Forensic Sci 2000; 45: 1210-1231

Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. J Cell Physiol 1988; 136: 507-513

Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. Biochem J 2003; 370: 751-762

Ruiz-Pesini E, Lapena AC, ez-Sanchez C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Diaz M, Urries A, Montoro L, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. Am J Hum Genet 2000; 67: 682-696

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350-1354

Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74: 5463-5467

Santos C, Montiel R, Sierra B, Bettencourt C, Fernandez E, Alvarez L, Lima M, Abade A, Aluja MP. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol Biol Evol* 2005; 22: 1490-1505

Santos C, Sierra B, Alvarez L, Ramos A, Fernandez E, Nogues R, Aluja MP. Frequency and pattern of heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 2008; 67: 191-200

Sato A, Nakada K, Akimoto M, Ishikawa K, Ono T, Shitara H, Yonekawa H, Hayashi J. Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 6057-6062

Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991; 196: 137-140

Schapira AH . Mitochondrial disease. *Lancet* 2006; 368: 70-82

Schmitt ME, Clayton DA. Conserved features of yeast and mammalian mitochondrial DNA replication. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 769-774

Schmitt TJ, Robinson ML, Doyle J. Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion on the Wave Nucleic Acid Fragment Analysis System. *Transgenomic Inc* 2000; Application Note 112:

Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002; 347: 576-580

Schwartz M, Vissing J. No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *J Neurol Sci* 2004; 218: 99-101

Sekiguchi K, Kasai K, Levin BC. Inter- and intragenerational transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13 maternally-related individuals and differences between and within tissues in two family members. *Mitochondrion* 2003; 2: 401-414

Servidei S . Mitochondrial encephalomyopathies:gene mutation. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 848-853

Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 409-435

Shitara H, Hayashi JI, Takahama S, Kaneda H, Yonekawa H. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* 1998; 148: 851-857

Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990; 61: 931-937

Sood P . Heteroplasmic mutation in DL1 loop of mitochondrial in human muscle, brain and blood. Master thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2009;

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790

Stoneking M . Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1029-1032

Stoneking M, Sherry ST, Redd AJ, Vigilant L. New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1992; 337: 167-175

Stoneking M, Soodyall H. Human evolution and the mitochondrial genome. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 731-736

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999; 402: 371-372

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 2000; 63: 582-590

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 512-526

Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL, Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Zeviani M, Briem E, Carrara F, Turnbull DM. Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol* 2003; 54: 521-524

Thyagarajan B, Padua RA, Campbell C. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 27536-27543

Tully LA, Parsons TJ, Steighner RJ, Holland MM, Marino MA, Prenger VL. A sensitive denaturing gradient-Gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 432-443

van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, Welsh-Bohmer KA, Saunders AM, Roses AD, Small GW, Schmechel DE, Murali DP, Gilbert JR, Haines JL, Vance JM, Pericak-Vance MA. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett* 2004; 365: 28-32

van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH, Jr., Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 804-811

Wallace DC . Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992; 256: 628-632

Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999; 238: 211-230

Wang Q, Boles RG. Individual human hair mitochondrial DNA control region heteroplasmy proportions in mothers and children. *Mitochondrion* 2006; 6: 37-42

Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 2006; 281: 25791-25802

Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, Miller CA, Askanas V, Engel WK, Bhasin S, Attardi G. Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4022-4027

Wanrooij S, Luoma P, van GG, van BC, Suomalainen A, Spelbrink JN. Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3053-3064

Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Paabo S. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8720-8724

Westermann B . Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 2002; 3: 527-531

White DJ, Gemmell NJ. Can indirect tests detect a known recombination event in human mtDNA? *Mol Biol Evol* 2009; 26: 1435-1439

White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol* 2008; 17: 4925-4942

Wiesner RJ, Zsurka G, Kunz WS. Mitochondrial DNA damage and the aging process: facts and imaginations. *Free Radic Res* 2006; 40: 1284-1294

Wulfert M, Kupper AC, Tapprich C, Bottomley SS, Bowen D, Germing U, Haas R, Gattermann N. Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* 2008; 36: 577-586

Wulfert M, Tapprich C, Gattermann N. Optimized PCR fragments for heteroduplex analysis of the whole human mitochondrial genome with denaturing HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 831: 236-247

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17: 439-474

Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346

Zhang J, sin-Cayuela J, Fish J, Michikawa Y, Bonafe M, Olivieri F, Passarino G, De BG, Franceschi C, Attardi G. Strikingly higher frequency in centenarians and twins of mtDNA mutation causing remodeling of replication origin in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1116-1121

Zsurka G, Baron M, Stewart JD, Kornblum C, Bos M, Sassen R, Taylor RW, Elger CE, Chinnery PF, Kunz WS. Clonally expanded mitochondrial DNA mutations in epileptic individuals with mutated DNA polymerase gamma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 857-866

Zsurka G, Hampel KG, Kudina T, Kornblum C, Kraytsberg Y, Elger CE, Khrapko K, Kunz WS. Inheritance of mitochondrial DNA recombinants in double-heteroplasmic families: potential implications for phylogenetic analysis. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 298-305

Zsurka G, Hampel KG, Nelson I, Jardel C, Mirandola SR, Sassen R, Kornblum C, Marcorelles P, Lavoue S, Lombes A, Kunz WS. Severe epilepsy as the major symptom of new mutations in the mitochondrial tRNAPhe gene. *Neurology* 2010; 74: 507-512

Zsurka G, Kraytsberg Y, Kudina T, Kornblum C, Elger CE, Khrapko K, Kunz WS. Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple

mitochondrial DNA heteroplasmy. Nat Genet 2005; 37: 873-877

Zsurka G, Schroder R, Kornblum C, Rudolph J, Wiesner RJ, Elger CE, Kunz WS. Tissue dependent co-segregation of the novel pathogenic G12276A mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) mutation with the A185G D-loop polymorphism. J Med Genet 2004; 41: e124

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfram Kunz, für die interessante Themenstellung, sein zu Verfügung gestelltes Wissen, seine engagierte Unterstützung, seine tatkräftige Hilfe und seine Geduld.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Gabor Zsurka bedanke ich mich herzlich für die intensive Betreuung bei der Durchführung der einzelnen Arbeitsmethoden, die ständige Gesprächsbereitschaft, die vielen anregenden Diskussionen und die Durchsicht meiner Dissertation.

Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. med. Christian Elger, Frau PD. Dr. med. Cornelia Kornblum und allen Patienten bzw. deren Angehörigen für das Zuverfügungstellen der Gehirn- und Muskelproben, welche die Untersuchungen überhaupt erst möglich gemacht haben.

Dank gebührt zudem allen Mitarbeitern der AG-Kunz, die durch die freundliche Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Doktorarbeit geleistet haben.

Des weiteren danke ich Herrn Patrick Kampkötter und Herrn Prof. Dr. rer. pol. Oded Löwenbein († 27.11.2009) für die Beratung und Hilfestellung in statistischen Fragen sowie Frau Renate Demtröder und Herrn Christof Wasser für das Korrekturlesen der Doktorarbeit.

Zum Schluß bedanke ich mich vor allem bei meinen Eltern, meiner Freundin und meinen Freunden für die fürsorgliche Unterstützung und ihre stete Bereitschaft, sich meine Probleme anzuhören.